

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie, genetika a virologie



Bc. Violeta Bakardjieva – Mihaylova

Studium životního cyklu BK viru

Analysis of BK virus life cycle

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: RNDr. Alena Morávková, Ph.D.

Praha, 2012

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 09.05.2012

Podpis

Na tomto místě bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Aleně Morávkové, Ph.D. za veškerou pomoc a neocenitelné rady, které mi nesmírně pomohly při vypracování této práce. Dále bych velice poděkovala vedoucí naší laboratoře Doc. RNDr. Jitce Forstové CSc. za profesionální a přátelské vedení naší laboratoře a za možnost zúčastnit se virologického výzkumu. Moje poděkování patří také členům laboratoře molekulární virologie, zejména Mgr. Borisi Ryabchenkovi za pomoc s metodami FISH, konfokální mikroskopií a kvantitativní real time PCR, dále Mgr. Martinu Fraiberkovi a Mgr. Vojtovi Žílovi za zhotovení elektronmikroskopických snímků a Mgr. Lence Horníkové za zodpovězení nadměrného počtu dotazů. Dále bych ráda poděkovala Vlastě Sakařové a Ivaně Polívkové za zajištění dobrého pracovního zázemí a Daně Beronové za pomoc s administrativou. Jsem také velice vděčná ostatním členům naší laboratoře za veškerou pomoc a přátelské prostředí.

Velice si cením také pomoci a podpory svých rodičů, svého manžela a syna a rodičům mého manžela bez jejichž podpory by tato práce nevznikla.

Předkládaná diplomová práce vznikla v letech 2010 – 2012 za podpory grantu GAČR P304/10/1511 a Výzkumného záměru MSM0021620858.

OBSAH

1. ÚVOD	14
2. CÍLE	16
2.1 Určení klíčových bodů BK virového životního cyklu.....	17
2.1.1 Pomnožení BK viru v buňkách HRPTEC, které představují přirozený model pro studium tohoto lidského patogenu.	17
2.1.2 Izolace BK viru - určení jeho množství a infekivity.....	17
2.1.3 Určení začátku virové replikace a její vliv na procesy v hostitelské buňce	17
2.1.4 Určení postinfekčních časů, ve kterých dochází k expresi časných a pozdních virových genů na úrovni RNA a proteinů	17
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	18
3.1 Polyomaviry	19
3.2 Lidské Polyomaviry.....	19
3.3 BK virus - kapsida a genom	22
3.4 Ranné fáze infekce BK virem.....	24
3.5 BK virová replikace	29
3.6 Časné proteiny BK viru	30
3.7 Strukturní proteiny BK viru	31
3.8 Kinetika exprese BK virových produktů ve srovnání s modelovými zástupci polyomavirů MPyV a SV40.....	33
3.9 BK virus a jeho tumorogenní potenciál.....	35
4. MATERIÁL A METODY	38
4.1 MATERIÁL.....	39
4.1.1 Přístroje.....	39
4.1.2 Chemikálie.....	40
4.1.3 Buněčné linie.....	42
4.1.4 Viry	42
4.1.5 Plazmidy	42
4.1.6 Protilátky.....	42
4.1.6.1 Primární protilátky	42
4.1.6.2 Sekundární protilátky.....	43
4.1.7 Primery.....	44
4.1.8 Média pro buněčné kultury	45
4.1.9 Používané roztoky	45

4.1.10	Markery molekulových hmotností.....	46
4.1.10.1	DNA marker.....	46
4.1.10.2	Proteinový marker Sigma SDS7B2.....	47
4.2	METODY	48
4.2.1	Práce s lidskými buňkami z renálních proximálních tubulů ledvin (HRPTEC)	48
4.2.1.1	Rozmražení buněčné konzervy	48
4.2.1.2	Synchronizace HRPTE buněk	49
4.2.1.3	Příprava buněk pro namnožení viru.....	49
4.2.1.4	Infekce buněk za účelem namnožení viru pro izolaci	49
4.2.2	Izolace BK viru	49
4.2.2.1	Centrifugace přes sacharosový polštář.....	50
4.2.2.2	Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu.....	50
4.2.2.3	Dialýza	51
4.2.2.4	Imunofluorescenční určení virového titru	51
4.2.2.5	Fixace buněk pro imunofluorescenci	52
4.2.2.6	Imunofluorescenční značení buněk	52
4.2.2.7	Hemaglutinační test	52
4.2.3	Průtoková cytometrie	53
4.2.4	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	54
4.2.4.1	Příprava sondy pro <i>in situ</i> hybridizaci	54
4.2.4.2	Vlastní <i>in situ</i> hybridizace.....	54
4.2.5	Práce s proteiny	55
4.2.5.1	Příprava buněčných lyzátů	55
4.2.5.2	Příprava vzorků pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu	56
4.2.5.3	SDS polyakrylamidová elektroforéza	56
4.2.5.4	Fixace a barvení gelu.....	56
4.2.5.5	Western blotting	57
4.2.5.6	Dot blot	57
4.2.5.7	Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na nitrocelulózové membráně.....	57
4.2.5.8	Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové.....	58
4.2.6	Práce s RNA	59
4.2.6.1	Izolace celkové RNA High Pure Isolation Kit (Roche)	59
4.2.6.2	Příprava cDNA kitem iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO RAD)	59

4.2.7	Práce s DNA.....	60
4.2.7.1	Agarózová elektroforéza	60
4.2.7.2	Izolace DNA Hirtovu metodou	60
4.2.7.3	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	61
4.2.7.4	Kvantitativní <i>real time</i> PCR.....	62
4.2.7.5	Vizualizace replikačních ložisek.....	62
5.	VÝSLEDKY.....	63
5.1	Ověření negativy HRPTE buněk na BK virus.....	64
5.2	Ověření infekivity BKV na HRPTE buňkách	65
5.3	Izolace BK viru	66
5.4	Izolace RNA z infikovaných buněk.....	72
5.5	Určení času exprese virových proteinů.....	75
5.6	Určení začátku virové replikace	80
5.7	Reinfekce.....	84
5.8	Ovlivnění buněčného cyklu BK virovou infekcí	88
5.9	Kvantitativní <i>real time</i> PCR	92
6.	DISKUSE.....	94
6.1	Ověření negativy HRPTE buněk na BK virus.....	95
6.2	Určení virové identity.....	95
6.3	Izolace BK viru	95
6.4	Izolace RNA z infikovaných buněk.....	96
6.5	Určení exprese virových proteinů.....	97
6.6	Určení začátku virové replikace	98
6.7	Reinfekce.....	99
6.8	Ovlivnění buněčného cyklu BK virovou infekcí	100
6.9	Kvantitativní <i>real time</i> PCR	100
7.	SOUHRN	102
7.1	Pomnožení viru v buňkách HRPTEC, izolace BKV, určení jeho množství a infekivity. 103	
7.2	Určení začátku virové replikace a postinfekčních časů, kdy dochází k expresi časných a pozdních virových proteinů. Vliv infekce na procesy v hostitelské buňce.....	103
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	105

Studium životního cyklu BK viru

Abstrakt: Polyomaviry jsou malé neobalené DNA viry, jejichž replikace probíhá v buněčném jádře. I přes svoji malou genomovou velikost mohou tyto viry způsobit výrazné změny v hostitelské buňce, jednou z nejvýznamnějších je nádorová transformace. Většina studií lidských patogenů z této čeledi je středem zájmu klinických výzkumů, které však neposkytují dostatek informací o jednotlivých událostech životního cyklu virů. Tato práce se hlavně zabývá přesným určením doby kdy dochází ke vzniku jednotlivých virových produktů a vytvořením časového sledu událostí během infekce v přirozených buňkách, které jsou cílem pro BKV v lidském organismu. Bylo zjištěno, že časový průběh životní cyklus BKV se velice podobá těm pro modelové polyomaviry MPyV a SV40 a v permissivních buňkách trvá přibližně 40 - 50 hodin.

Klíčová slova: BK virus, lidský patogen, životní cyklus viru, HRPTEC, replikace, exprese, VP1, LT

Analysis of the BKV Life Cycle

Abstract: Polyomaviruses are small unenvelope DNA viruses, whose replication take place in cell nucleus. Despite its small genome size, these viruses can cause significant changes in the host cell, one of the most significant is cell transformation. Most studies of human pathogens from this family is the focus of clinical research, but do not provide enough information about the individual events of the life cycle of viruses. This thesis mainly aims to determining the exact time when the creation of the individual viral products and generate a timeline of events during natural infection in cells that are targets for BKV in the human body. It was found that the time course of the life cycle of BKV is very similar to those for model polyomaviruses MPyV and SV40 and in permissive cells takes about 40 - 50 hours.

Key words: BK virus, human pathogen, virus life cycle, HRPTEC, replication, expression, VP1, LT

Seznam použitých zkratk:

ATTC	American Type Cell Collection
BKV	BK virus
bp	base pairs (páry bazí)
BSA	bovine serum albumin (bovinní sérum albumín)
cDNA	complementary DNA (sekvence DNA vzniklá komplementárním přepisem RNA)
C _t	cycle threshold (počet cyklů potřebných pro fluorescenční signál převyšující prahovou hodnotu)
DAPI	4,6-diamidino-2-fenylindol dihydrochlorid
dd H ₂ O	demineralizovaná destilovaná voda
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
DP	diplomová práce
dpi	dny po infekci
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (kyselina ethylendiamintetraoctová)
ER	endoplazmatické retikulum
FBS	fetal bovine serum (fetální bovinní sérum)
FFU	fluorescent forming unit
FISH	fluorescent in situ hybridization
GA	Golgiho aparát
hpi	hodiny po infekci
HPyV	Human polyomavirus (lidský polyomavirus)
HRPTEC	human renal proximal tubul epithelial cells (lidské buňky z renálních proximálních tubulů ledvin)

IFN- γ	interferon gama
KIV	Karolinska institutet virus
LT	large T antigen (velký T antigen polyomavirů)
MAP kináza	mitogen-activated protein kinases (mitogenem aktivované proteinkinázy)
MHC	major histocompatibility complex (hlavní histokompatibilní komplex)
MPyV	mouse polyomavirus (myší polyomavirus)
mRNA	messenger RNA (mediátorová RNA)
MT	middle T antigen (střední T antigen polyomavirů)
NCCR	non-coding control region (nekódující kontrolní úsek)
NLS	nuclear localosation signal (jaderný lokalizační signál)
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PML NBs	promyelocytic leukemia nuclear bodies
PML	progressive multifocal leukoencephalopathy
PMSF	fenylmethylsulfonyl fluorid
PVAN	polyomavirus-induced nephropathy (nefropatie indukovaná polyomavirem)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
rRNA	ribosomal RNA (ribozomální RNA)
rpm	rotate per minute (otáčky za minutu)
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)
Sf9	Spodoptera frugiperda cells (buňky z Spodoptera frugiperda)
SSC	saline-sodium citrate (citrát sodný)

ST	small T antigen (malý T antigen polyomavirů)
SV40	simian virus 40 (opičí virus 40)
tRNA	transfer RNA (transférová RNA)
UV	ultraviolet (ultrafialové světlo)
VP1	viral protein 1 (hlavní strukturní protein polyomavirů)
VP2	viral protein 2 (minoritní protein polyomavirů)
VP3	viral protein 3 (minoritní protein polyomavirů)
WUV	Washington University virus

1. ÚVOD

Tato práce vznikla jako výsledek snahy o lepší porozumění událostí během infekčního cyklu lidského patogenu BK viru. I přes závažnost problémů, které tento virus působí imunosuprimovaným jedincům, zejména po transplantaci ledvin, není životní cyklus BK viru prostudován. Vzhledem k tomu, že současný trend v moderní medicíně mluví o rostoucím počtu transplantací a vývoji dokonalejších imunosupresiv, které by potlačily odmítnutí transplantovaného orgánu, je snaha o studium BK viru žádoucí. Dalším důvodem pro studium BK viru je dosud neobjasněná strategie, jakou imunitní systém využívá pro potlačení BK virové infekce za imunokompetentního stavu organismu a jen malá škála léčiv používaných pro potlačení reaktivace viru. Většina léčiv používaných pro léčbu PVAN není specifická pro BK virus a tedy není dosti účinná. Hlavní snaha pro zabránění reaktivace BK viru spočívá v nižším stupni navozené imunosuprese, který ale sebou přináší riziko odmítnutí transplantovaného orgánu.

Proto může tato práce, která je zaměřená na základní výzkum BK viru, být přínosná nejen z hlediska výzkumného, ale i na poli praktického využití poznatků o replikačním cyklu viru, expresi virových produktů a jejich působení na hostitelskou buňku. To byl i hlavní důvod proč byly pro studium životního cyklu BKV zvoleny právě buňky HRPTE, které jsou jedny z mála přirozených cílů pro virus v lidském organismu, i přes uskalí, která přináší práce s primárními buňkami.

2. CÍLE

2.1 Určení klíčových bodů BK virového životního cyklu

- 2.1.1 Pomnožení BK viru v buňkách HRPTEC, které představují přirozený model pro studium tohoto lidského patogenu.
- 2.1.2 Izolace BK viru - určení jeho množství a infekivity
- 2.1.3 Určení začátku virové replikace a její vliv na procesy v hostitelské buňce
- 2.1.4 Určení postinfekčních časů, ve kterých dochází k expresi časných a pozdních virových genů na úrovni RNA a proteinů

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Polyomaviry

Modelovým zástupci této virové čeledi jsou myší polyomavirus a virus SV40.

Myší polyomavirus byl prvně popsán v roce 1953 při studiích přenosu myší leukémie (Gross, 1953). Tehdy se zjistilo, že v bezbuněčných lyzátech z myší trpících leukemií je přítomno agens způsobující nádory u zdravých zvířat, původcem přenosu byl myší polyomavirus.

Mezi primáty modelové polyomaviry řadíme virus SV40, který byl objeven jako kontaminující agens ve vakcínách proti polio viru, produkovaných v opičích buňkách. Tato vakcína byla použita u stovek tisíc lidí. Zmíněný incident vedl k rozsáhlému výzkumu SV40 (Sweet and Hilleman, 1960).

3.2 Lidské Polyomaviry

Jako viry jejichž přirozeným hostitelem je člověk byly do roku 2007 řazeny dva polyomaviry a to BK virus a JC virus. V dnešních dnech je počet virů, u kterých je prokázáno, že mohou infikovat člověka mnohem vyšší. Je to sedm polyomavirů (KI virus, WU virus, Merkel cell polyomavirus, HPyV6, HPyV7, trichodysplasia spinolosa-associated polyomavirus a HPyV9). Virová DNA a protilátky byly v člověku nalezeny i proti opičímu lymfotropnímu polyomaviru, což naznačuje, že i on by mohl infikovat člověka (Van Ghelue M. et al., 2012). Také u viru SV40 jsou domněnky, že by mohl infikovat lidské buňky a mít podíl i na některých nádorových onemocněních člověka (Barbanti-Brodano et al., 2004).

Viry BK a JC jsou v lidské populaci široce zastoupeny, zhruba 35-85% lidské populace je seropozitivní na tyto virové zástupce. Ve většině případů je infekce lidským polyomavirem bezpříznaková s výjimkou zbytkového množství virové genové exprese (Dorries K. et al., 1998), občasná reaktivace se projevuje u 0,5-20 % zdravých seropozitivních jedinců. Tato reaktivace se prezentuje limitovanou virovou replikací (Kahan A. et. al 1980). Zvýšená hladina

titru sérových protilátek proti BK a JC viru byla pozorována u těhotných žen během druhého trimestru, a tyto hodnoty přetrvávaly až do konce těhotenství. Specifický imunologický stav během těhotenství (zvýšené množství monocytů a snížené množství neutrofilů) je pravděpodobně příčinou polyomavirové reaktivace (Coleman D., et al. 1980,1983). Tato reaktivace, zdá se, není příčinou pro přenos viru z matky na plod během těhotenství, i přes to, že bylo zjištěno, že většina žen v těhotenství vylučuje v moči BK virus v důsledku imunosuprese. Zjistilo se totiž, že enzym zodpovědný za vytváření $\alpha(2,3)$ vázané sialové kyseliny na gangliosidech GD1b a GTb, sloužících jako receptory pro virus, je v 80% sníženém množství v tkáních obklopující plod. Tato kontrola množství receptorů pro BKV v okolí plodu je pravděpodobně zodpovědná za protekci plodu při probíhající reaktivaci viru u matky (Low et al., 2005; Zhu et al., 1990).

Mnohem častější je však reaktivace lidských polyomavirů při imunosupresi, jaká se vyskytuje u pacientů s AIDS a u příjemců implantovaných orgánů (Sundsford et al., 1994, Gardner S. 1984). Lytická infekce BK viru po reaktivaci může být bezpříznaková, ale ve většině případů je asociovaná s hemoragickou cystitidou, infekcí močového měchýře projevující se zánětem a přítomností krve v moči. Takovéto komplikace se mohou objevit i u pacientů po transplantaci kostní dřeně nebo pacientů po transplantaci ledvin, ale i jiných orgánů jako je srdce, játra i pankreas (Jiang et al., 2009; Bressollette-Bodin et al.,2005; Egli et al., 2007). Reaktivace BK viru je situována v urogenitálním traktu a označuje se jako *nefropatie indukovaná polyomavirem* z anglického *Polyomavirus-induced nephropathy* (PVN). Tato nefropatie se vyskytuje zhruba u 5 % pacientů po transplantaci ledvin a v 50-70 % těchto případů končí tato BK virem způsobená komplikace ztrátou transplantovaného orgánu (Eash et al., 2004), (viz tab. 3.1).

V případě JC viru, který je neurotropní a napadá centrální nervovou soustavu, je nemoc označována jako *progresivní multifokální encefalopatie* z anglického *progressive multifocal leukoencephalopathy* (PML). Jedná se o lytickou infekci myelinprodukcujících oligodendrocytů v centrální nervové soustavě. I u tohoto polyomaviru se má za to, že je ve většině případů latentní,

pouze při iminosupresi putuje po nervových buňkách do CNS a napadá oligodendrocyty (Major et al., 1992).

studie	pracoviště	případy výskytu PVAN v %	ztráta transplantátu po vypuknutí PVAN v %
Mengel et al. 2003	Hannover, Germany	1,1	71
Trofe et al. 2003	Cincinnati, USA	2,1	54
Buehrig et al. 2003	Rochester NY, USA	2,7	38
Ginevri et al. 2003	Genua, Italy	3,0	33
Rocha et al. 2004	Durham, NC, USA	3,1	-
Rahaminov et al.	Petah, Israel	3,8	14
Kang et al. 2003	Seoul, South Korea	3,9	100
Vasudev et al. 2005	Milwaukee WI, USA	4,0	48
Ramos et al. 2002	Baltimore MD, USA	5,1	82
Hirsch et al. 2002	Basel, Switzerland	6,0	0
Lipshutz et al. 2004	San Francisco, USA	6,0	56
Namba et al. 2005	Osaka, Japan	6,9	33
Li et al. 2002	Bethesda MD, USA	7,0	33
Maiza et al. 2002	Lyon, France	7,1	50
Matlosz et al. 2004	Warsaw, Poland	7,9	-
Moriyama et al. 2003	Osaka, Japan	10,3	22
průměrně		5,0	46

Tabulka 3.1 Komplikace PVAN po transplantaci ledviny a procento ztráty transplantátu po této komplikaci. Převzato a upraveno z Egli et al., 2007

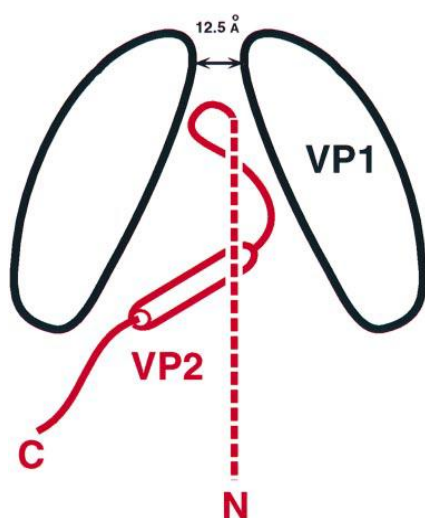
Prvně byl BK virus identifikován v roce 1970 Silvii Gardner. Virové partikule byly izolovány ze vzorku moče pacienta po transplantaci ledvin. Jméno viru má původ v iniciálech tohoto pacienta (Gardner S. et al. 1971). Pozdější studie ukázaly, že virus infikuje primárně mandle, infekce se následně šíří tělem infikovanými monocyty a virus infikuje další tkáně a orgány, zvláště pak ledviny, kde se ustavuje permanentní ve většině případů bezpříznaková infekce (Portolani et al., 1985). Bylo zjištěno, že virus způsobuje lytickou lýzi infikované buňky, což má za příčinu přesun imunokompetentních buněk do místa infekce (Hirsch HH. et al., 2003). Zánětlivé reakce pak mohou způsobit poškození tkáně ledvin a narušit funkci poškozeného orgánu. V dalších studiích se ukázalo, že na infekci BK viru má vliv gama interferon (IFN- γ) produkováný lymfocyty, který udržuje infekci u zdravých jedinců v mezích subklinického projevu. Interferon

má vliv na množství T antigenu v infikovaných buňkách a také na množství produkovaných virů (Abend et al., 2007).

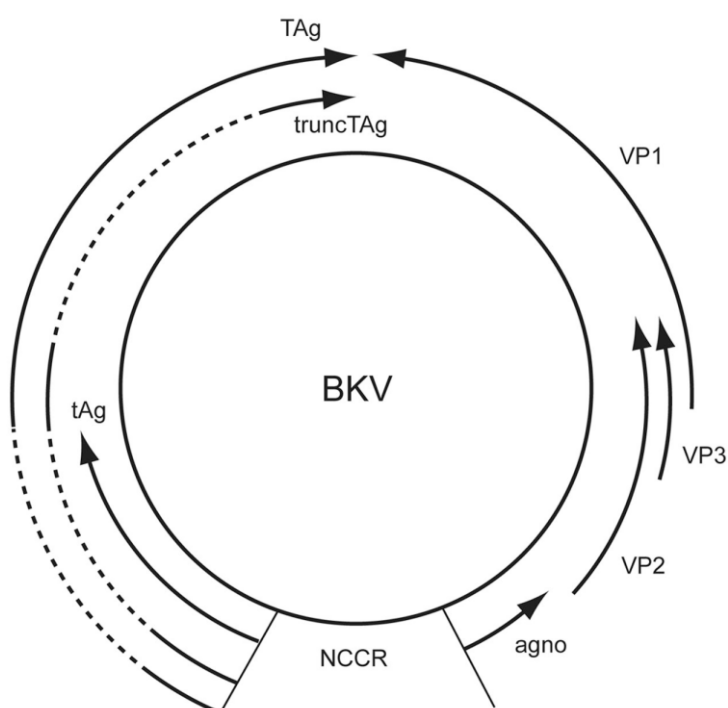
Jinými postupy pro léčbu zánětu způsobeného BK virem je užívání analogu cytosinu (cidofovir), přípravek cidofovir byl také zkoumán na SV40 viru a myším polyomaviru, u nichž inhibuje množení (Andrei et al., 1997). Dalším možným postupem pro inhibici replikace SV40 a BKV je užití fluoroquinolonů, inhibující topoizomerázu II a stabilizující vazbu enzymu na DNA (Ali et al., 2007).

3.3 BK virus - kapsida a genom

Polyomaviry jsou malé, neobalené DNA viry. Stejně jako u ostatních polyomavirů je kapsida BK viru složená ze 72 pentamerů VP1 proteinu, které tvoří 12 pentavalentních a 60 hexavalentních struktur skládajících se v ikosahedrální virovou kapsidu (Rayment et al., 1982). Vyčnívající C konec z VP1 proteinu umožňuje jeho interakci se sousedním pentamerem (Liddington et al., 1991). Minoritní proteiny VP2 a VP3 jsou situovány ve vnitřní prohlubni pentameru (viz obr. 3.1) tvořeného VP1 proteiny, v jednom pentameru se nachází jeden nebo druhý z minoritních proteinů. Bylo dokumentováno, že stačí jedna kopie C konce VP2 nebo VP3 proteinu k vytvoření vazby s pentamerem VP1 proteinu, tato vazba je tvořena převážně hydrofóbními interakcemi (Chen et al., 1998). Hlavní kapsidový protein VP1 také interaguje s virovým genomem. Genom BK viru můžeme rozdělit do tří částí: časný region, pozdní region a část regulační neboli *non-coding control region* (NCCR, viz obr. 3.2). Časná a pozdní transkripce probíhají v opačném směru a obě začínají z NCCR, kde jsou sekvence regulující transkripci a počátek virové replikace (Abend et al., 2007). BK virus kóduje celkem sedm virových proteinů, a to v časně fázi proteiny: velký T antigen, malý T antigen a nově objevený zkrácený T antigen (Abend et al., 2009). Proteiny v časně fázi infekce vznikají alternativním sestřihem z časně mRNA. V pozdní fázi infekce vznikají strukturní proteiny VP1, VP2, VP3 a agnoprotein (Cole et al., 2001).



Obrázek 3.1 Schématické znázornění interakce mezi VP1 a VP2 proteinem. Převzeto a upraveno z Chen et al., 1998.



Obrázek 3.2 Schéma BK virového genomu. Reprezentuje kruhový, dvouvláknový, cirkulární genom BK viru s vyznačenými časnými a pozdními oblastmi a NCCR - *non-coding control region* - plné šipky ukazují otevřené čtecí rámce, přerušované šipky znázorňují introny v časných fázích. Transkripce časných a pozdních oblastí probíhá ve směru šipek. Převato a upraveno z Abend et al., 2009.

3.4 Ranné fáze infekce BK virem

Dočasné poznání o BK viru bylo dosaženo studiem infekce opičích Vero buněk. V dnešní době je snaha poznatky o BK viru rozvinout na modelu infekce přirozených pro infekci tímto virem HRPTE buněk. Tato skutečnost může způsobovat rozdílné jevy pozorované v novém modelu studia, protože se ukazuje, že buněčný typ má značný vliv na životní cyklus viru (Moriyama et al., 2007). U člověka jsou tři specifické buněčné typy, které virus infikuje. Jsou to lymfocyty mandlí, mononukleární buňky v periferní krvi a epiteliální buňky ledvin. Buňky z renálních proximálních tubulů ledvin se ve fyziologicky pracující ledvině podílejí na udržení krevního tlaku a objemu krve, též produkují a vylučují do svého okolí cytokiny a chemokiny a tímto komunikují s imunitním systémem (Daha et al., 2000).

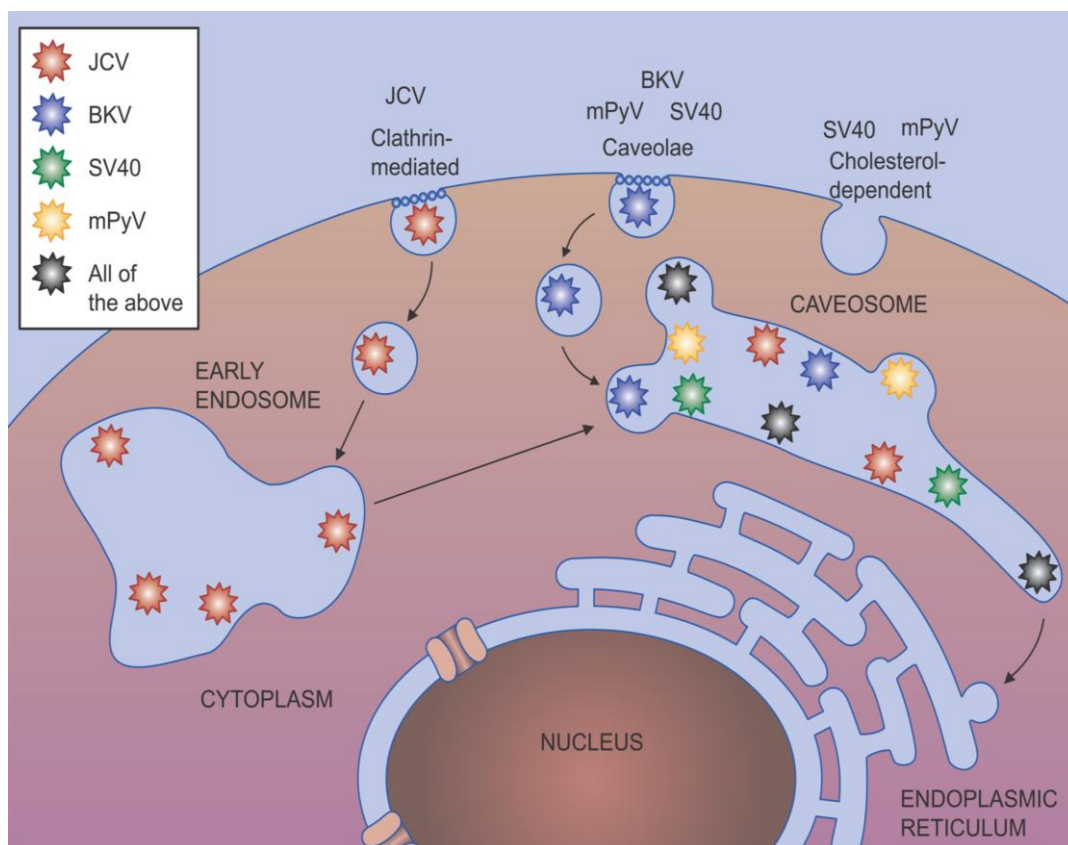
Infekce začíná přichycením na buněčné gangliosidové receptory GD1b a GT1b (Low et al., 2005), následuje internalizace a transport virové DNA do jádra. Při přichycování viru k buňce hrají roli molekuly sialové kyseliny, galaktózy a polysialované gangliosidy. Tyto poznatky byly dosaženy řadou experimentů, některé z nich jsou dále uvedené.

Studie při kterých byla odstraněna $\alpha(2,3)$ vázaná sialová kyselina z povrchu Vero buněk prokázala, že u takto modifikovaných buněk dochází k značnému poklesu infikovaných buněk (Dugan et al., 2005). Opačný experiment, při kterém byly k buňkám, které BK virus nemůže přirozeně infikovat, přidány gangliosidy GD1b a GT1b, prokázal, že takto modifikované buňky jsou dostupné pro BKV (Low et al., 2005). Dalším experimentem v této práci bylo prokázáno, že BK virus má schopnost vázat se na membránové struktury erytrocytů a za tuto vazbu zodpovídá molekula neproteinové povahy, narušitel od JC viru využívajícího proteinový receptor. Membrány erytrocytů byly dále opračované neuraminidázou, která štěpí kyselinu sialovou vázanou k proteinům nebo lipidům. Takto provedené pokusy poukázaly na značnou důležitost kyseliny sialové při vazbě viru na buněčné membrány. S ohledem na již známé receptory jiných polyomavirů jako jsou SV40 a MPyV, kterými jsou

molekuly gangliosidů, byly provedeny pokusy, které měly za cíl zjistit, zda i receptor pro BK virus není gangliosidová molekula. K tomuto účelu byly připraveny liposómy obsahující různé gangliosidy a bylo zjištěno, že právě gangliosidy GD1b a GT1b byly schopny dostatečně pevně vázat BK virus, tyto molekuly obsahovaly α 2-8 vázanou sialovou kyselinu, která se ukázala jako velice důležitá součást vazby viru na buněčnou membránu (Low et al., 2005).

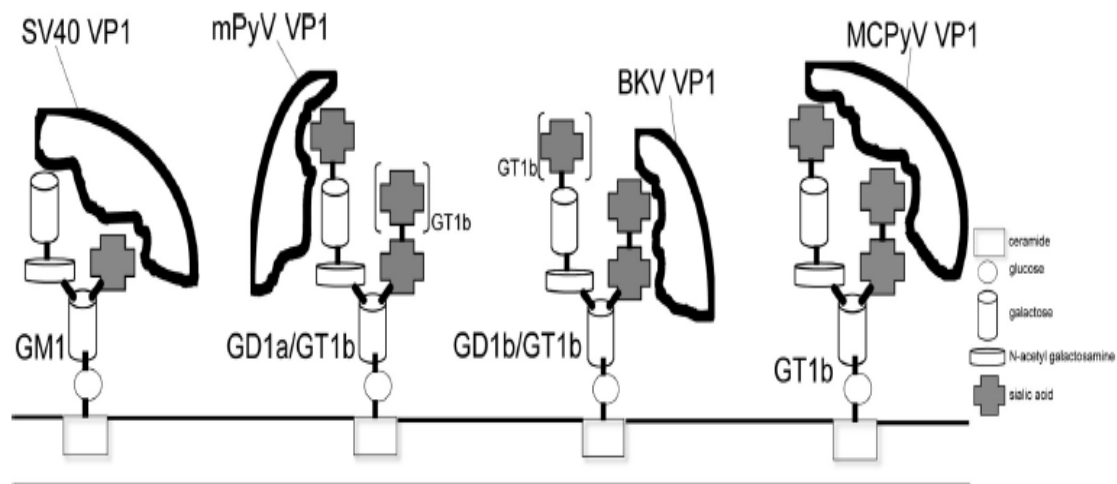
BK virus vstupuje do buňky pravděpodobně přes organely obsahující kaveolin, provedené pokusy, kdy došlo k narušení mRNA pro Kaveolin-1, ukazují, že tato molekula je nezbytná pro infekci BKV. Stejně tak molekula cholesterolu, která je jednou z hlavních složek kaveolinových váčků je nezbytná pro vstup viru do buňky. S ohledem na tyto výsledky bylo shrnuto, že BK virus vstupuje do HRPTE buňek přes kaveolinové váčky (viz obr. 3.3). Organely označované jako kaveoly obsahují virus v největší míře v době 4 hodiny po infekci. Tento časový sled ukazuje na relativní zpoždění BK virové infekce v porovnání s SV40 virem i s mPyV, kdy tyto viry byly v největší míře přítomny v kaveolách 1 hpi. (Moriyama et al., 2007).

Nejnovější studie však popírají některé údaje o vstupu příbuzného SV40 viru do buňky, jehož cesta je jak se zdá velice podobná jako u BKV. Jedná se zejména o popření modelu vstupu viru přes váčky bohaté na kaveolin, které postrádají proteinové struktury typické pro endozomy. Tato dřívější cesta předpokládala vstup viru do ER bez účasti endozomů a nezávislost viru na pH (Pelkmans et al., 2001). Dnešní model poukazuje na endozomální původ váčků přenášejících virus z povrchu buňky, role endozomů byla potvrzena sérií experimentů, při kterých se pomocí siRNA inhibovala produkce proteinů typických pro endozomy, u takto inhibovaných buněk pak docházelo k prudkému poklesu infikovanosti. Zdá se také, že kaveozomy, pokládány dříve za hlavní transportní struktury pro SV40, jsou odvozené od pozdních endozomů nebo lysozomů, u nichž je nadprodukce kaveolinu (Engel et al., 2011). Další pokusy v této práci ukazují i na významný vliv pH při infekci SV40.



Obrázek 3.3 Model vstupu nejvíce prostudovaných polyomavirů. Převzato a upraveno z Neu et al., 2009.

Při studiích sledující další cestu BK viru buňkou bylo zjištěno, že BK virus cestuje skrz ER při své snaze dosáhnou buněčné jádro. To se shoduje s představou o průběhu infekce u virů SV40 a MPyV, kde receptory těchto virů GM1 pro SV40 a GD1a společně s GD1b pro myší polyomavirus (viz obr. 3.4) slouží jako přenašece z plazmatické membrány k endoplazmatickému retikulu (Gilbert et al., 2004; Norkin et al., 2002). Při provedených pokusech se ukázalo, že membrány endoplazmatického retikula obsahují receptory pro BK virus, tato skutečnost podporuje hypotézu o cestě BK viru přes ER k buněčnému jádru (Low et al., 2005).



Obrázek 3.4 Modely různé interakce VP1 proteinu s gangliosidy na buněčném povrchu. Převzato a upraveno z Erickson et al., 2009.

Ukazuje se, že velice důležitou fází infekce u všech polyomavirů je interakce s buněčným cytoskeletem. Obzvláště nutné pro produktivní infekci jsou intaktní mikrotubuly (viz tab. 3.2). Porušení mikrotubulárních vláken mezi 8 a 12 hodinou po infekci vede k značnému snížení infekтивности u MPyV, tento jev je pozorován i u viru SV40, kdy kritická nutnost intaktních mikrotubulů nastává mezi 3 a 6 hodinou po infekci (Pelkmans et al., 2001). Rozrušení mikrotubulové sítě v době 4 hodin po infekci má za následek značnou inhibici exprese velkého T antigenu při infekci virem SV40 (Shimura et al., 1987). Virová infektivita byla značně snížena i u JCV v přítomnosti nokodazolu, bránící polymeraci mikrotubulů (Ashok et al., 2003). U BK viru bylo zjištěno, že depolymerace mikrofilament v prvních 8 hodinách po infekci působí značné snížení infekтивности viru. Potlačení obratu mikrotubulů nečinilo problém pro probíhající infekci. Indukované rozrušení aktinových filament také nebránilo probíhající infekci (Eash and Atwood., 2005).

Bylo demostrováno, že BK virová infekce vyžaduje nízké pH, kdy se zdá, že virus cestuje do buněčného kompartmentu s nízkým pH velice brzy po internalizaci, následuje pohyb viru po intaktních mikrotubulech a cesta do endoplazmatického retikula (Jiang et al., 2008). V pokusech provedených ve

studii Moriyama et al., 2008 se potvrdilo, že rozrušení mikrotubulů, má za následek neschopnost viru infikovat buňku, při dalších pokusech bylo též jasné, že molekulární motor dynein se nepodílí na produktivní infekci. Při dalším postupu studie vyplynulo, že BK virus dosahuje do ER v době mezi 6 a 10 hpi, zdá se také, že virus buď obchází GA nebo v něm setrvává velmi krátce (Moriyama et al., 2008).

	BKV	JCV	SV40	MPyV
receptory	$\alpha(2,3)$ -vázaná sialová kyselina GD1b,GT1b	terminálně $\alpha(2,3)$ -vázaná sialová kyselina GT1b	GM1 receptor, vazba nezávislá na sialové kyselině	$\alpha(2,3)$ -vázaná sialová kyselina GD1a,GT1b, GM1
ko-receptory	není znám	serotoninový receptor (5HT-2a)	MHC I	$\alpha 4\beta 1$ integrin
mechanismus vstupu	zprostředkován kaveoly	závislý na klatrinu	primárně zprostředkován kaveoly	různé v závislosti na buněčném typu
cytoplasmatický transport	váčky mezi ER a GA	není znám	fúze do kaveozomů a lokalizace do ER	endozóm s kaveolinem-1 a lokalizace do ER
pH	závislý	závislý	nezávislý	není známo
účast cytoskeletu	neporušené mikrotubuly, zhroucená mikrofilamenta	neporušené mikrotubuly a intermediální filamenta, dynamická mikrofilamenta	neporušené mikrotubuly a dynamická mikrofilamenta	neporušené mikrotubuly a dynamická mikrofilamenta

Tabulka 3.2 Různé strategie vstupu Polyomavirů. Převzato a upraveno z Dugan et al., 2006

Dalším důležitým krokem při infekci BKV je rozvolnění virové kapsidy, disulfidické vazby mezi VP1 proteiny začínají být rozvolňovány v rozmezí 8-12 hodin po infekci (Jiang et al., 2008). Je-li virová DNA v jádře, začíná interagovat s jadernými strukturami ve snaze ovlivnit prostředí v jádře pro optimální virovou replikaci. Příkladem takových změn jsou interakce velkého T antigenu s členy retinoblastomové proteinové rodiny. Velký T antigen se zároveň váže na p53

protein a zmenoží tomuto proteinu aktivovat transkripci genů jemu ovlivněných. Všechny tyto změny vedou buňku do S fáze, což poskytuje BK viru buněčný replikační aparát.

3.5 BK virová replikace

Replikace BK viru je spojena s interakcí s mnoha jadernými a subjadernými komponentami. Jednou z takových jsou i *promyelocytic leukemia nuclear bodies* (PML-NBs). Tyto multiproteinová tělíska pravděpodobně hrají regulační roli u mnoha infekcí DNA i RNA viry (Jiang et al., 2011). V případech infekce CMV, adenovirem a virem SV40 bylo zjištěno, že tyto viry uchovávají své genomy, replikují své proteiny a transkribují časně proteiny v blízkosti PML-NBs. U neinfikovaných buněk jsou PML tělíska zapojena do regulace apoptózy, buněčné diferenciace, regulaci transkripce a odpovědi buňky na poškození DNA (Jul-Larsen et al., 2004). Zdá se, že BK virová infekce ovlivňuje množství i velikost PML-NBs během infekce v HRPTE buňkách, tato alterace BK viru má pravděpodobně za úkol snížit antivirové účinky hlavního proteinu v PML-NBs, kterým je PML protein (Jiang et al., 2011). V předem jmenované studii je naznačeno, že infekce BK virem snižuje počet PML-NBs v buněčném jádře, tělíska jsou větší a mají změněné proteinové složení. Další výsledky ukazují na schopnost BK viru zrušit antivirový účinek PML-NBs během infekce. Dále bylo demonstrováno, že PML tělíska nejsou esenciální pro BK virovou infekci, jako je tomu i u jiného lidského polyomaviru JCV (Gasparovic et al., 2009). Předpokládá se, že BK virus inaktivuje PML tělíska a proto v mutantních buňkách bez PML tělísek může probíhat BK virová infekce. Cílení virové DNA do PML tělísek je zdá se závislé na aktivní replikaci této DNA. Některé výsledky naznačují i roli PML tělísek v post replikačních úpravách replikované virové DNA, tento mechanismus je pravděpodobně stejný jakým se PML tělíska účastní i metabolismu buněčné DNA. Zdá se, že PML tělíska mají schopnost akumulovat nově syntetizovanou DNA v buňce, z tohoto důvodu je v jejich okolí detekována virová replikující se DNA. (Jul-Larsen et al., 2004).

3.6 Časné proteiny BK viru

Časný úsek polyomavirového genomu je transkribován ihned po internalizaci viru a mimo jiné obsahuje gen kódující velký T antigen, tento virový protein je konzervován mezi všemi zástupci polyomavirové čeledi. K ovlivnění buněčného cyklu a zabránění vstupu buňky do apoptózy je nutné, aby T antigen interagoval s proteiny regulující buněčný cyklus jako jsou p53 a pRb (Ahuja et al., 2005; Ali and DeCaprio, 2001; Pipas and Levine, 2001). Replikace DNA je zahájena po interakci počátku replikace s T antigenem, kdy se ATP váže na ATPázovou domenu na T antigenu, což způsobuje vyšší afinitu vazby LT s počátkem replikace a zároveň hexamerizaci T antigenu, který pak rozvíjí dvouvláknovou DNA virového genomu (Li et al., 2003). Hexamer LT také interaguje s proteiny nutnými pro replikaci jako jsou: DNA topoizoméráza I, replikační protein A a DNA polymerázou α (Arunkumar et al., 2005; Jiang et al., 2006). Další doménou T antigenu důležitou pro virovou replikaci je J doména, která se nachází na N konci LT (Kim et al., 2001). Doména J je konzervovaná a ve své struktuře obsahuje čtyři helikální svazky podobné těm v Hsp 40 šaperonu. Tato doména je také zodpovědná za interakci mezi šaperony Hsp40 a Hsp70 a její mutace má za následek nízký počet virů vzniklých po infekci. Zdá se také, že J doména interaguje i s transkripčním faktorem E2F, který reguluje buněčný cyklus. Komplex T antigenu a Hsp70 má podíl i na buněčné tumorigenezi a rozvolnění virové kapsidy (Campbell et al., 1997).

V nové studiích vzniklé v roce 2009 byla potvrzena existence třetího časného proteinu vznikajícího při BK virové infekci, je to zkrácený T antigen z anglického *truncated T antigen*, jehož délka je 133 aminokyselin, a schoduje se s prvními 133 aminokyselinami z N konce velkého T antigenu. Tato část T antigenu obsahuje vazebnou doménu pro pRb proteinovou rodinu a J doménu. Přítomnost zkráceného T antigenu byla potvrzena jak při lytické infekci, tak i v případech buněčné transformace. Výskyt této formy T antigenu byl pozorován již v roce 1989 ve studiích Bollag et al., ale předpokládalo se, že to je důsledek proteolitické degradace velkého T antigenu. Ve studiích Abend et al., 2009 bylo ukázáno, že zkrácený T antigen vzniká alternativním sestřihem časně pre-

mRNA, kdy z tohoto transkriptu jsou odstraněny dva introny. Bylo také ukázáno, že zkrácený T antigen je cílen do buněčného jádra jak v případě společné exprese s ostatními T antigeny, tak i v jejich nepřítomnosti. I u dalších polyomavirů byla prokázána přítomnost zkrácenin T antigenu, vzniklých alternativním sestřihem. Jsou to například myší polyomavirus a primátí SV40 a JCV, u všech se zkrácený T antigen pravděpodobně účastní buněčné transformace společně s ostatními časnými proteiny, protože má mnoho domén interagujících s regulatory buněčného cyklu.

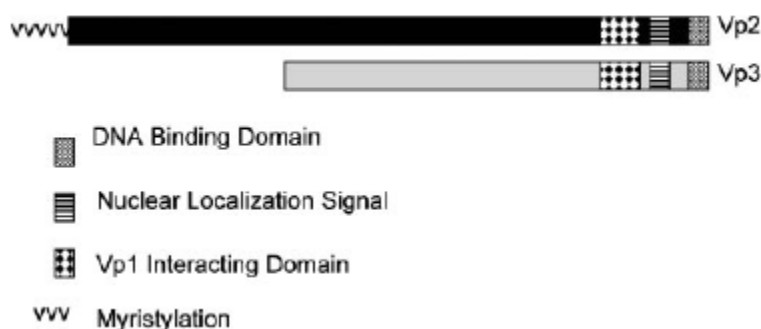
3.7 Strukturní proteiny BK viru

Jednotlivé kapsidové proteiny byly analyzovány pomocí dvourozměrné elektroforézy, imunoblotingu a hmotnostní spektrometrie. Tyto postupy ukázaly na množství modifikací v strukturních proteinech BKV. U hlavního kapsidového proteinu byly pozorovány modifikace jako: karboxymethylace, methylace, oxidace, fosforylace, formylace. U VP2 proteinu to byly: karboxymethylace, acetylace, formylace, oxidace, deoxidace a fosforylace. Podobné byly i modifikace u VP3 proteinu, tento protein je ze 2/3 identický s VP2 proteinem, ale i přes to byla u něho identifikována rozdílná modifikace, která se nevyskytovala u VP2, a to acetylace (Fang et al., 2010).

Protein VP2 je ze 2/3 své délky identický s proteinem VP3. Rozdílnost jejich sekvence je pouze na N konci VP2 proteinu, kde se nachází jeho modifikace myristilovou kyselinou. Společná část obou proteinů je složená z jederného lokalizačního signálu (NLS), DNA vázající domény a části interagující s VP1 (viz obr. 3.5). Studie provedené v posledních letech potvrzují důležitost virových minoritních proteinů v produktivní virové infekci. Zdá se, že viru podobné částice, skládající se pouze z hlavního kapsidového proteinu JCV, jsou neschopné ochránit virovou DNA před degradací DNázami (Wang et al., 2004). V práci Gasparovic et al., 2006 bylo ukázáno, že oba minoritní proteiny, stejně tak i myristilovaná část VP2 proteinu jsou nezbytné pro průběh a

dokončení virového lytického cyklu. U JCV je jaderný lokalizační signál přítomný na hlavním povrchovém proteinu VP1 nedostatečný a virus pro svou dopravu do jádra pravděpodobně spoléhá na minoritní proteiny. Jiné studie provedené na viru SV40 zase předpokládají nutnou přítomnost VP2 a VP3 pro složení virové kapsidy za fyziologických podmínek (Kawano et al., 2006). Později bylo při studiích SV40 mutant postrádajících proteiny VP2 a VP3 zjištěno, že VP1 protein je dostačující pro přichycení virionu k buňce a vstupu viru a úloha VP2 a VP3 je v dopravě virového genomu do jádra (Nakanishi et al., 2007).

Role myristilace na N konci VP2 proteinu myšího polyomaviru byla zkoumána v práci Mannová et al., 2002. Přípravou mutantních virů, exprimujících nemyristilovaný VP2 protein, bylo zjištěno, že tato modifikace má pouze mírný vliv na produktivní infekci v buňce. Mutantní viry měly pouze nízký pokles infekivity, což je pravděpodobně způsobeno tím, že se myristilace podílí na interakci virionu s buněčnými strukturami při vstupu viru. Úplná delece minoritních proteinů však má za následek ovlivnění virového infekčního cyklu již v jeho časných fázích.



Obrázek 3.5 Schématické znázornění minoritních proteinů polyomaviru s vyznačenými funkčními doménami. Převzato a upraveno z Gasparovic et al., 2006.

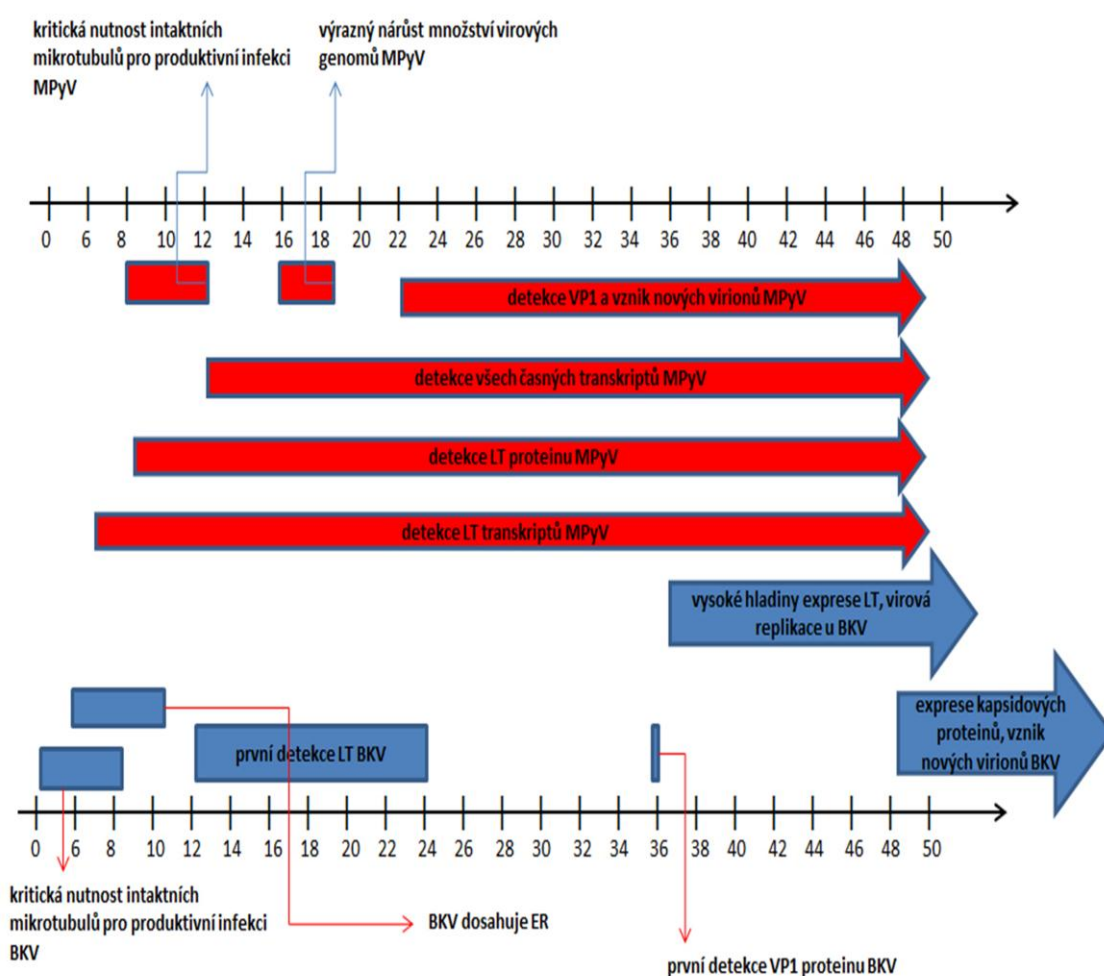
3.8 Kinetika exprese BK virových produktů ve srovnání s modelovými zástupci polyomavirů MPyV a SV40

Je poměrně málo studií BK viru vzniklých při infekci buněk HRPTE, které jsou přirozeným cílem viru. Jedna z těchto studií je práce Low et al., 2004, která ukazuje na fakt vzniku lytického replikačního cyklu po infekci BKV. Zde také byly zkoumány hladiny exprese virového T antigenu během infekce. Prvně byl LT antigen detekován mezi 12 a 24 hpi. Vysoké hladiny exprese tohoto proteinu byly zaznamenány 36 hpi. Prvně byl *de novo* vzniklý kapsidový VP1 protein detekován 36 hpi, vysoké hladiny VP1 byly zaznamenány v 48 hpi, hladina tohoto proteinu stále stoupala až do doby ukončení experimentu v 11 dpi. První zvýšení hladiny virových genomů bylo zaznamenáno v 36 hpi, což je 12 hodin po začátku exprese časného virového produktu - LT antigenu. Virová replikace, exprese kapsidových proteinů a vznik nových virionů byly zaznamenány 48 hpi, (Low et al., 2004), (viz graf 3.1).

Nejrozsáhlejší studie kinetiky polyomavirů byla provedena na modelu myšího polyomavirů. V ní se ukazuje, že se časné transkripty ve velice nízké míře dají detekovat metodou *Northern blot* před 24 hpi, rychlý nárůst množství virové RNA lze pozorovat mezi 20 a 24 hodinou po infekci, kdy dochází až 63x nárůstu jejich množství. Pro přesnější detekci virových produktů byla použita metoda *real time* PCR, při níž se detekovaly časné virové transkripty pro LT, MT a ST proteiny. V 6 hodinách po infekci byl prvně velice slabě detekován velký T antigen, bez přítomnosti transkriptů ostatních časných proteinů. Transkripty všech časných produktů lze s určitostí potvrdit v 12 hpi (Chen and Fluck 2001).

Pro detekci časných i pozdních proteinů byla ve stejné práci použita metoda detekce proteinů na membráně. Velký T antigen byl prvně detekován v 8 hpi, imunofluorescenčním barvením bylo pozorováno, že 36 hpi po infekci s multiplicitou 10 je infikováno 100% buněk.

Pro detekci nárůstu množství virových genomu byla použita metoda *Southern blot*, při níž bylo zjištěno, že k výraznému nárůstu množství virových genomů dochází mezi 16 a 18 hodinou po infekci, což se schoduje i s dobou, kdy se hostitelská buňky nachází v S fázi buněčného cyklu. Produkce kapsidového VP1 proteinu je detekovatelná 22 hpi a jeho množství se zvyšuje kontinuálně do 48 hpi, kdy byl experiment ukončen. Počet nových intracelulárních virových částí se zvyšoval také po 22 hpi, což koreluje se vznikem strukturních virových proteinů (Chen and Fluck., 2001), (viz graf 2.1).



Graf 3.1 Znázornění některých podstatných událostí během životního cyklu MPyV a BKV. Interpretace ze studií (Chen and Fluck., 2001), (Moriyama et al., 2008) a (Low et al., 2004)

3.9 BK virus a jeho tumorogenní potenciál

V případě BK viruové infekce se předpokládají dvě možné cesty pokračování infekce v závislosti na permissivitě napadené buňky. V případě permissivního hostitele, po vstupu virionu začíná amplifikace virové DNA, vznikají virové proteiny, potažmo nové viriony, napadená buňka je zlyzována a virové potomstvo se uvolní do okolí napadené buňky. Bylo ale také zjištěno, že exprese BK virových časných proteinů v savčích tkáňových kulturách může způsobit transformaci těchto buněk. To nastává v případě nepermissivity hostitelské buňky, kdy virová replikace vede k abortivní infekci a buněčné transformaci, která je charakteristická expresí časných genů (Imperiale et al., 2000, 2001; Tognon et al., 2003). Mimo transformaci v tkáňové kultuře bylo ukázáno, že BK virový T antigen má možnou souvislost i s mnoha jinými lidskými nádory jako jsou nádory mozku, urogenitálního traktu a i s Kaposiho sarkomem, v těchto případech není role BK viru zcela potvrzená (viz tab. 3.3). Hlavní virový protein zodpovědný za transformaci buněk je časný protein viru velký T antigen, který se váže na buněčné tumorsupresorové proteiny jako jsou: p53, pRb, p107 a p130. Ukazuje se, že T antigen BK viru může inhibovat buněčnou odpověď na poškození DNA a indukovat proliferaci buňky, což způsobuje nahromadění mutací a případnou nádorovou transformaci (Harris et al., 1996). Dalším případným onkogenem při infekci BKV je malý t antigen, je to protein bohatý na cysteiny o délce 172 aminokyselin, kdy prvních 80 aminokyselin je schodných s velkým T antigenem. Hlavní roli při buněčné transformaci má inhibice proteinfosfatázy 2A malým t antigenem, což způsobuje stimulaci MAP kinázové dráhy a buněčnou proliferaci (Sontag et al., 1993).

Při pokusech, kdy byl BK virus injektován intracerebrálně nebo intravenózně do křečků, krys nebo novorozených myší, se ukázalo, že v 75% těchto případů došlo ke vzniku nádoru obsahujícího virové proteiny a části virového genomu (Imperiale and Major 2007). I přes nepotvrzenost účasti BK viru při vzniku lidských nádorů, BK virové sekvence byly nalezeny v mnoha lidských nádorech, včetně těch v urogenitálním traktu (Abend et al., 2009). Ve studiích (Monini et al., 1995) bylo analyzováno 89 vzorků pocházejících z urogenitálního traktu nebo z prostaty, kde byla zjištěna přítomnost BK

virového genomu v 50-83% vzorků. Sekvenční analýza PCR produktů BK virové DNA ve studovaných vzorcích identifikovala nový BK virový kmen pojmenovaný URO1, který se vyznačuje změnami v regulační části virové sekvence. Tyto změny v NCCR, by mohly mít vliv na virovou replikaci a zvýšenou schopnost transformovat hostitelskou buňku. Zdá se, že v některých lidských nádorech jsou přítomny intaktní časné oblasti BK virového genomu, které by mohly přispívat k tumorigenezi. U buněk s URO1 kmenem BKV dochází k inhibici replikace za stálé exprese velkého T antigenu, pravděpodobně je tak bráněno buněčné smrti a to vede k transformaci (Abend et al., 2009).

Při formulaci tvrzení o BK virové účasti na vzniku nádorů je potřeba uvažovat několik okolností specifických pro infekci tímto virem. Buňky vyskytující se v okolí nádoru by mohly obsahovat virový genom a být nesprávně považovány za součást nádoru, to by vedlo k falešné pozitivitě na BK virus. Další okolností je nemožnost studia viru ve zvířecích modelech a přítomnost viru v téměř celé populaci, kdy tato okolnost znemožňuje srovnání s vzorky, kde virus není přítomen, ale zároveň poskytuje možnost pro rozsáhlejší populační studie (Abend et al., 2009).

Table 1 Presence and expression of BKV DNA in human tumors, tumor cell lines and normal tissues

<i>Tissues and cell lines</i>	<i>BKV DNA Positive samples/samples analysed (%)</i>		<i>Reference</i>	<i>Method^a</i>	<i>BKV RNA^b Positive samples/samples analysed</i>
<i>Tumors</i>					
Brain tumors	19/74	(26)	Corallini <i>et al.</i> (1987b)	SBH	
Brain tumors	11/24	(46)	Dorries <i>et al.</i> (1987)	SBH	
Brain tumors	0/75		Arthur <i>et al.</i> (1994)	PCR	
Brain tumors	50/58	(86)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	
Brain tumors	74/83	(89)	Martini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Brain tumors	0/10		Völter <i>et al.</i> (1997)	PCR	
Neuroblastoma	18/18	(100)	Flægstad <i>et al.</i> (1999)	PCR	
Bone tumors	11/25	(44)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	8/11
MED and PNET ^c	0/20		Kim <i>et al.</i> (2002)	PCR	
Insulinomas	4/9	(44)	Corallini <i>et al.</i> (1987b)	SBH	
Hodgkin's diseases	0/5		Völter <i>et al.</i> (1997)	PCR	
ALL ^d	0/15		Mackenzie <i>et al.</i> (1999)	PCR	
Kaposi's sarcoma	4/20	(20)	Barbanti-Brodano <i>et al.</i> (1987, 1988)	SBH	
Kaposi's sarcoma	38/38	(100)	Monini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Kaposi's sarcoma	0/2		Völter <i>et al.</i> (1997)	PCR	
Urinary tract tumors	31/52	(60)	Monini <i>et al.</i> (1995a, b)	PCR	
Urinary tract tumors	0/15		Völter <i>et al.</i> (1997)	PCR	
Genital tumors	32/42	(76)	Monini <i>et al.</i> (1995a, b, 1996)	PCR	
<i>Cell lines from</i>					
Brain tumors	8/10	(80)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	5/5
Brain tumors	21/26	(81)	Martini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
MED and PNET	0/2		Kim <i>et al.</i> (2002)	PCR	
Bone tumors	20/20	(100)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	6/8
Kaposi's sarcoma	6/8	(75)	Monini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Kaposi's sarcoma	0/14		Völter <i>et al.</i> (1997)	PCR	
<i>Normal tissues</i>					
Brain	13/13	(100)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	
Bone	2/5	(40)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	2/2
Urinary tract	15/26	(58)	Monini <i>et al.</i> (1995a, b)	PCR	
Adrenal gland	0/5		Flægstad <i>et al.</i> (1999)	PCR	
Genital tissues	28/39	(72)	Monini <i>et al.</i> (1995a, 1996)	PCR	
PBMC ^e	25/35	(71)	De Mattei <i>et al.</i> (1995)	PCR	8/8
PBMC	53/79	(76)	Martini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Lymphnodes	4/4	(100)	Monini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Skin	25/33	(76)	Monini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Sperm	18/20	(90)	Martini <i>et al.</i> (1996)	PCR	
Sperm	18/19	(95)	Monini <i>et al.</i> (1996)	PCR	

^aSBH: Southern blot hybridization; PCR: polymerase chain reaction, ^bDetected by Northern blot hybridization or RT-PCR, ^cMED and PNET: medulloblastoma and primitive neuroectodermal tumor, ^dALL: acute lymphoblastic leukemia, ^ePBMC: peripheral blood mononuclear cells from healthy donors

Tabulka 3.3 Souhrnná tabulka, reprezentující detekci BK virové DNA v různých typech lidských nádorů, nádorových buněčných liniích a normálních buněčných linií. Převzato a upraveno z Tognon *et al.*, 2003.

4. MATERIÁL A METODY

4.1 MATERIÁL

4.1.1 Přístroje

Analytické váhy Pioneer™

Aparatura pro horizontální agarózovou elektroforézu multiSub Mini (Cleaver)

Aparatura pro SDS-PAGE (Hoefer)

Aparatura pro Western blot TE22 (Hoefer)

Centrifuga 3K30, rotory 12171, 12154-H, 19776-H (Sigma)

Centrifuga Beckman Centrifuge GS-15R, rotor S4180 (Beckman)

Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus Sepatech)

Centrifuga s výkyvným rotorem MSE (MSE)

CO₂ termostat (Forma Scientific)

Elektronový mikroskop JEOL JEM 1200 EX

Fluorescenční invertovaný mikroskop Olympus IX71

Fluorescenční mikroskop BX-60 (Olympus)

Konfokální mikroskop TCS SP2 Laser Scanning Confocal Microscope (Leica)

Laminární box (Forma Scientific)

Mikrocentrifuga Microfuge Lite 16, rotor A46544 (Beckman)

Mikrocentrifuga Microfuge Lite, rotor F1802 (Beckman)

Mikrocentrifuga Microfuge R, rotor F241.5 (Beckman)

Mikrocentrifuga MiniSpin plus, rotor IL 016 (Eppendorf)

PCR cyklér Mastercycler EPgradient S (Eppendorf)

Průtokový cytometr LSR II (BD)

Refraktometr ABBE (Carl Zeiss Jena)

Sonikátor Branson 5 (Cole-Parmer Instrument Company)

Spektrofotometr Helios β (Thermo Electron)

Spektrofotometr ND – 1000 (NanoDrop)

Termostat TCH 100 (laboratorní přístroje Praha)

Ultracentrifuga Optima TM L-90K, rotory SW 28, SW 41 (Beckman)

UV transluminátor (BioLum)

Váhy KERN 440-33

Vodní lázeň SUB (Grant)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

4.1.2 Chemikálie

Agaróza pro elektroforézu (Amresco)

Agaróza SeaPlaque (FMC Bioproducts)

Akrylamid (Serva)

Amonium persulfát - APS (Serva)

Aprotinin (Sigma)

Bisakrylamid (Serva)

Bovinní sérový albumin - BSA (Sigma)

Bromfenolová modř (Serva)

Cesium chlorid (Serva)

Coomassie Brilliant Blue G250 - CBBG250 (Serva)

Deoxyribonukleosid trifosfáty - dNTPs (Sigma)

Dextran sulfát (Sigma)

Dimethylsulfoxid - DMSO (Sigma)

Dithiothreitol - DTT (Roche)

Dodecylsulfát sodný – SDS (Sigma)

Ethanol - EtOH (Penta)

Ethylendiamintetraacetát disodný - EDTA (Serva)

Fenol (Sigma)

Fenylmethylsulfonyl fluorid - PMSF (Sigma)

Formamid (Serva)

Glukóza (Serva)

Glycerol (Penta)

Glycin (Serva) 56

Hydroxid sodný (Penta)

Chlorid draselný (Lachema)

Chlorid hořečnatý (Lachema)

Chlorid sodný (Penta)

Chlorid vápenatý (Sigma)

Chloroform (Lachema)
Izoamylalkohol (Lachema)
Izopropylalkohol (Penta)
Kyselina boritá (Serva)
Kyselina chloristá (Lachema)
Kyselina chlorovodíková (Lachema)
Kyselina octová (Lachema)
Kyselina p-kumarová (Sigma)
L-glutamin (Sigma)
Luminol (Serva)
Methanol (Lachema)
N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin - TEMED (Sigma)
Parafínový olej Bayol F (Serva)
Paraformaldehyd - PFA (Sigma)
Peroxid vodíku (Sigma)
Sacharóza (Lachema)
Salmon sperm DNA (Invitrogen)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan - TRIS (Serva)
Triton X-100 (Serva)
Tween 20 (Fluka)
Versen (Sevac)
Želatína z prasečí kůže (Sigma) 57
 β -merkapt ethanol (Serva)

4.1.3 Buněčné linie

HRPTEC	lidská primární buněčná linie, odvozená z renálních proximálních tubulů ledvin. Buněčná linie byla zakoupena od firmy Lonza (product code: cc-2553).
SF9	hmyzí buněčná linie odvozená z tkáně vaječníků motýla <i>Spodoptera frugiperda</i> . Buněčná linie byla získána z americké sbírky buněčných linií (angl. American Type Cell Collection no. CRL 1711)

4.1.4 Viry

Lidský BK virus	kmen Dunlop, plazmid pBKV 34-2, obsahující BK virový genom byl získán z ATTC.
-----------------	---

4.1.5 Plazmidy

plazmid pBKV 34-2 obsahující BK virový genom byl získán z ATTC

4.1.6 Protilátky

4.1.6.1 Primární protilátky

anti BKV VP1	králíčí polyklonální protilátka proti hlavnímu strukturnímu proteinu lidského BK viru, použité ředění 1:250 (připraveno v naší laboratoři - Boháčová, Pappová)
--------------	--

anti SV40 LT	myší monoklonální protilátka proti LT antigenu SV40 viru, použité ředění 1:150 (Abcam)
anti SV 40 VP2/3	myší polyklonální protilátka proti VP2/3 proteinům SV40 viru, použité ředění 1:500
anti biotin	králíčí polyklonální protilátka proti biotinu, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:100 (Bethyl)
anti PML	myší monoklonální protilátka proti PML (PG – M3), ředěno 1:1000 (Santa cruz).

4.1.6.2 Sekundární protilátky

goat anti mouse Px	kozí protilátka proti myším imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, pro detekci proteinů na membráně, ředěno 1:1000 (Bio-Rad)
goat anti rabbit Px	kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s křenovou peroxidázou, pro detekci proteinů na membráně, ředěno 1:1000 (Bio-Rad)
goat anti rabbit AF 488	kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 488, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1000 (Invitrogen)
goat anti rabbit AF 546	kozí protilátka proti králíčím imunoglobulinům konjugovaná s Alexa fluor 546, pro imunofluorescenční značení ředěno 1:1000 (Invitrogen)

4.1.7 Primery

1. fragment genu pro LT antigen BK viru

BKV LT2 RIGHT - 5' TTG GCT GCA CTG TTT GCT AC 3'

BKV LT2 LEFT - 5' CCA TGT CCT GAA GGC AAA TC 3'

Oblast amplifikované genomové oblasti: 3335 – 3629 bp

Velikost amplifikovaného fragmentu: 294 bp

2. fragment genu VP1 SV40 viru

BKSV40 F - 5' GTC CAG GGG CAG CTC CC 3'

SV40 VP1B - 5' GCT GAC TGT CAA CTG TAG CA 3'

Oblast amplifikované genomové oblasti: 3335 – 3629 bp

Velikost amplifikovaného fragmentu: 537 bp

3. fragment genu VP1 BK viru

BKSV40 F – 5' GTC CAG GGG CAG CTC CC 3'

BKV VP1B - 5' TGG GAC TGG GCT GTT GGG 3'

Oblast amplifikované genomové oblasti: 3335 – 3629 bp

Velikost amplifikovaného fragmentu: 535 bp

4. fragment genu VP2 BK viru

MV_počátek - 5' C TAC GAG GAT CCT ATG GGT GCT GCT CTA GC 3'

MV_konec - 5' CGA CTG CTC GAG GCC TGA TTG CTG ATA GAG 3'

Primery ohraničují unikátní část proteinu VP2 BK viru, oblast amplifikované genomové oblasti: 624 – 981 bp

Velikost amplifikovaného fragmentu: 357 bp

4.1.8 Média pro buněčné kultury

- REBMTM Renal epithelial Cell Basal Medium (Lonza), s přidavkem REGMTMSingle Quots (recombinant human epidermal growth factor 0,1%, insulin 0,1%, hydrocortizone 0,1%, GA-1000 0,1%, FBS 0,5%, epinephrine 0,1%, T3 0,1%, transferrin 0,1%).
- REBMTM Renal epithelial Cell Basal Medium (Lonza), bez přidavků
- Médium pro buňky Sf9 s FBS: TNM-FH Insect Medium s L-glutamínem (Sigma) v ddH₂O, pH 6,2, 10% FBS, 1% 2 mM glutamín
- médium pro buňky Sf9 bez FBS: TNM-FH Insect Medium s L-glutamínem (Sigma) v ddH₂O, pH 6,2, 1% 2 mM glutamín

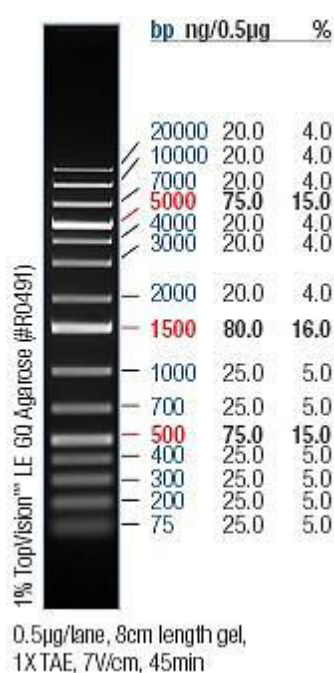
4.1.9 Používané roztoky

- barvicí roztok na akrylamidové gely (0,5% Coomassie Brilliant Blue G250, 3,5% HClO₄)
- blotovací pufr 1x (25 mM Tris, 195 mM glycín, 20% methanol, (pH=8,3))
- fixační roztok na akrylamidové gely (5% HClO₄, 50% methanol)
- Hirtův lyzační roztok (0,6% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 10mM EDTA)
- Laemliho pufr 5x (3% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH=6,8), 50% glycerol (v/v), 25% merkaptoethanol, 0,005% bromfenolová modř (w/v))

- PBS (Phosphate Buffered Saline) (1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na₂HPO₄.12H₂O, 18 mM KH₂PO₄, (pH=7,4))
- pufr B 1x (10 mM Tris – HCl (pH=7,4), 150 mM NaCl, 0,01 mM CaCl₂)
- pufr pro proteinovou elektroforézu (Running buffer) 10x (250 mM Tris, 1,92 M glycín, 1% SDS, (pH=8,3))
- pufr TBE 5x, objem 0,5 l (27 g Tris, 13,75 g kyseliny borité, 10 ml EDTA (pH=8), objem doplněn do 0,5 l destilovanou vodou)
- TE pufr (10 mM Tris-HCl (pH=7,4), 1 mM EDTA)
- Trypsin (0,25% roztok trypsinu v PBS)
- Versen (0,25% roztok versenu v PBS)

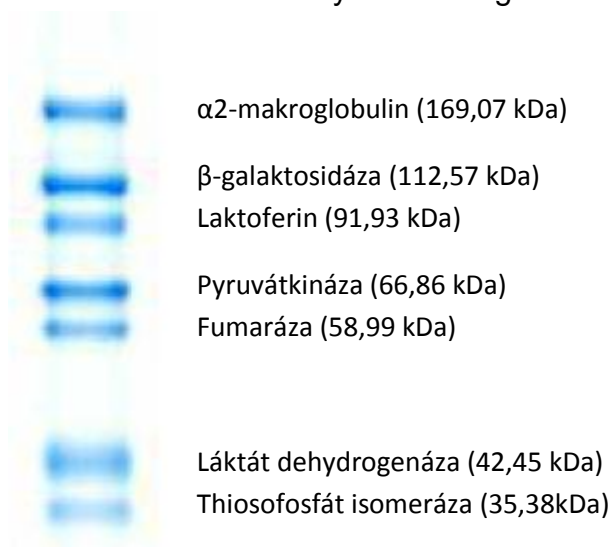
4.1.10 Markery molekulových hmotností

4.1.10.1 DNA marker



Obr 4.1 Marker O'GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas)

4.1.10.2 Proteinový marker Sigma SDS7B2



Obr 4.2 Velikosti proteinů v kDa u proteinového markeru Sigma, molekulové hmotnosti proteinů v markeru se liší v závislosti na šarži.

4.2 METODY

4.2.1 Práce s lidskými buňkami z renálních proximálních tubulů ledvin (HRPTEC)

Všechny úkony, při nichž byl používán lidský virus BKV byly prováděny v laminárním boxu v laboratoři s úrovní zabezpečení BSL2. Mimo tuto laboratoř byl infekční virus držen pouze v uzavřených nádobách. Nakládání s biologickým odpadem se řídilo příslušnými předpisy pro práci s GMO.

4.2.1.1 Rozmražení buněčné konzervy

HRPTE buňky byly uchovávány v tekutém dusíku. Mrazicí zkumavka o obsahu 1 ml buněčné suspenze byla rychle rozmrazena ve vodní lázni předehřáté na 37°C a buňky byly resuspendovány v 9 ml předehřátého sérového média. Buňky byly rozprostřeny na dvou petriho miskách o průměru 6 cm. Takto byly uchovávány do druhého dne v termostatu při 37°C a 5% CO₂. Druhý den bylo z každé misky odsáto médium a buňky byly opračované 0,5 ml roztoku Versenu. Po odsátí roztoku Versenu, na misku bylo dáno 0,3 ml Trypsinu. Poté co se buňky uvolnily z podkladu misky (kontrolováno vizuálně mikroskopem), bylo k buňkám přidáno 3 ml sérového média. Buňky byly resuspendovány a přeneseny do sterilní zkumavky, kde byla suspenze buněk naředěna sérovým médiem do celkového objemu 30 ml. Takto vzniklá suspenze byla rozdělena na 6 petriho misek o průměru 6 cm po 5 ml. Buňky byly obvykle pasážovány v poměru 1:6.

4.2.1.2 Synchronizace HRPTE buněk

Pro účely zajištění infekce buněk v přesně určenou dobu byla nutná synchronizace infikovaných buněk. Buňky byly inkubovány 18 – 20 hodin v médiu s obsahem 1% séra. Tím bylo zajištěno, že většina buněk pro danou infekci byly v G0 fázi buněčného cyklu.

4.2.1.3 Příprava buněk pro namnožení viru

Konfluentně narostlé buňky na petriho miskách o průměru 6 cm byly pasážovány v poměru 1:2 na petriho misky o průměru 10 cm. Takto bylo připraveno minimálně 10 misek o průměru 10 cm. Misky byly inkubovány v inkubátoru pro savčí kultury do doby, kdy dosáhly 75 % konfluence.

4.2.1.4 Infekce buněk za účelem namnožení viru pro izolaci

Z misek s narostlými buňkami bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 1 ml bezsérového média. Následně byly buňky infikovány s multiplicitou 0,1 a byly ponechány 7 dní v inkubátoru pro savčí kultury. Probíhající infekce byla kontrolována imunofluorescenčním značením virových proteinů a detekcí virových proteinů v lyzátech infikovaných buněk.

4.2.2 Izolace BK viru

Infikované buňky byly třikrát zmrazeny na - 70°C a opětovně rozmrazeny, čímž bylo zajištěno rozbití buněk a uvolnění viru z buněčných struktur. Po posledním rozmražení byly buňky seškrábány z misek a společně s médiem centrifugovány v 50 ml sterilní zkumavce (30 minut 4300 rpm). Supernatant byl odebrán a shromážděn ve sterilní nádobě. Sediment po této centrifugaci byl resuspendován v 5 ml 10 mM Tris (pH 7,4) a homogenizován v Potterově

homogenizátoru. K takto vzniklé suspenzi bylo přidáno 3,15 μ l neuraminidázy s konečnou koncentrací 0,63 μ l/ml a 5 μ l aprotininu s konečnou koncentrací 1 μ l/ml. Směs byla inkubována přes noc na třepačce při laboratorní teplotě. Druhý den po centrifugaci (30 minut 4300 rpm) byl supernatant spojen se supernatantem z předešlé centrifugace a pelet byl míchán 4 hodiny při laboratorní teplotě na třepačce po přidání 1,8 ml 10 mM Tris (pH 9). Po centrifugaci (30 minut, 4300 rpm) byl pelet vyhozen a supernatant přidán k celkovému supernatantu.

4.2.2.1 Centrifugace přes sacharosový polštář

Celkový supernatant byl rozdělen do centrifugačních zkumavek tak aby došlo k jejich naplnění ze 2/3. Na dno zkumavek byl opatrně napipetován roztok 10% sacharózy o objemu přibližně 2 ml. Centrifugační zkumavka se doplnila do výšky přibližně 2 mm pod horní okraj parafinovým olejem. Všechny takto připravené centrifugační zkumavky se před centrifugací vyvážíly s přesností na dvě desetinná místa, případné rozdíly hmotnosti byly dorovnány parafinovým olejem. Centrifugace probíhala po dobu 3 hodin na ultracentrifuze Beckman L5-50B, rotor SW 28, 25000 rpm, při 4°C. Po centrifugaci byl opatrně odstraněn supernatant a pelet byl resuspendován v 1 ml sterilního B pufru přes noc při teplotě 4°C.

4.2.2.2 Izopyknická centrifugace v CsCl gradientu

Sediment byl po centrifugaci přes sacharosový polštář a rozplavení v B pufru homogenizován ve skleněném homogenizátoru a naředěn B puftrem. Do centrifugační zkumavky bylo vždy přidáno 7,9 g virové suspenze naředěné v B pufru a 3,79 g CsCl. Zkumavka byla zaparafilmována a obsah důkladně promíchán, tak aby došlo k úplnému rozpuštění CsCl. Následně byl změřen refraktometrický index, který by se měl pohybovat v rozmezí 1,363 – 1,366, což odpovídá specifické hustotě virových partikulí 1,33 g/ml. Roztok byl po naplnění

zkumavek doplněn až po okraj parafinovým olejem a vyvážen na tři desetinná místa vzhledem k ostatním zkumavkám. Vzorky byly centrifugovány na ultracentrifuze Beckman L5-50B, rotor SW 41, 35000 rpm, 20 - 24 hodin při 18°C. Vzniklý gradient byl rozdělen rozdělovačem frakcí do zkumavek po 15 kapkách. U všech takto vzniklých frakcí byl změřen refraktometrický index a proveden imunologický test přítomnosti virového proteinu VP1 (viz tabulka 5.1, obr. 5.5, kap. 5.3). Na základě těchto testů byly spojeny všechny frakce obsahující plné viriony (refraktometrický index v rozmezí 1,365 – 1,366) a všechny frakce s prázdnými viriony (refraktometrický index v rozmezí 1,362 – 1,363). Následně byla provedena dialýza spojených frakcí plných a prázdných virionů.

4.2.2.3 Dialýza

Pro účely purifikace virové suspenze od CsCl byla provedena dialýza, při které dochází k průchodu nízkomolekulárních látek přes polopropustnou dialyzační membránu z prostředí o vyšší koncentraci solí do prostředí o nižší koncentraci. Dialyzační membrána byla povařena 10 minut v roztoku sterilního B pufru. Dovnitř byla dána virová suspenze a dialýza probíhala 1 hodinu ve 3 litrech vychlazeného 1M roztoku B pufru při 4°C za stálého míchání. Následně byl roztok B pufru vyměněn za čerstvý a dialýza pokračovala za stejných podmínek přes noc. Přečištěné frakce viru byly zahuštěny centrifugací přes sacharosový polštář (4.2.1.5) a rozpuštěny v 20 µl sterilního B pufru.

4.2.2.4 Imunofluorescenční určení virového titru

K určení titru vyizolovaného viru byly infikovány HRPTE buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách. Nejprve bylo připravené ředění viru, kdy k 1000 µl bezsérového média bylo přidáno 10 µl zásobního virového inokula, vzniklo tak ředění viru 10^{-2} , z tohoto roztoku byla následně postupným zředováním připravena ředící řada: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Připravené buňky byly infikovány vždy 200 µl suspenze viru o různé koncentraci vždy v duplikátech. Jako

negativní kontrola sloužily buňky k nimž byl přidán odpovídající objem bezsérového média. Infikované buňky byly ponechány 1 hodinu v inkubátoru (37°C, 5% CO₂) a následně bylo k buňkám přidáno sérové médium do výsledného objemu 1 ml. Infekce probíhala 48 hodin a poté byly buňky fixovány a imunofluorescenčně značeny.

4.2.2.5 Fixace buněk pro imunofluorescenci

Z infikovaných buněk bylo odsáto médium a buňky byly opláchnuty 1 ml PBS. Dále byl přidán 1 ml 3% roztoku paraformaldehydu, který působil 20 minut. Poté byl tento roztok odsát a po opláchnutí PBS pro TK byly buňky permeabilizovány 0,5% Tritonem X-100. Buňky byly 3 krát promyty 1 ml roztoku PBS.

4.2.2.6 Imunofluorescenční značení buněk

Fixované a permeabilizované buňky byly blokovány roztokem 0,25% želatiny a 0,25% BSA v PBS, po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Poté byly buňky 3 x promyty PBS a k buňkám byla přidána primární protilátka zředěná v blokačním roztoku. Inkubace s primární protilátkou trvala minimálně hodinu, následně byla primární protilátka odmyta 3 x po 10 minutách roztokem PBS a k buňkám byla přidána sekundární protilátka zředěná v blokačním roztoku, která působila 30 minut ve tmě a následně byla odmyta 3 x po 10 minutách roztokem PBS. Sklíčka byla opláchnuta v demineralizované vodě a ponechána na vzduchu. Suchá sklíčka byly přilepena na podložní mikroskopická skla, kde bylo předem nakapáno 4 µl roztoku 2% DAPI v 50% glycerolu.

4.2.2.7 Hemaglutinační test

Lidská krev skupiny 0 o objemu 5 ml byla naředěná přidáním 30 ml PBS pro tkáňové kultury s obsahem 0,2% BSA. Vzniklá suspenze byla

centrifugována 20 minut na Beckman Centrifuge GS-15R (8°C, 2400 rpm). Vzniklý pelet byl resuspendován 3 ml PBS pro TK, 30 µl této suspenze bylo dáno do heparinizované kapiláry, aby mohla být zjištěna koncentrace červených krvinek metodou hematokrytu. Kapilára byla z jedné strany zatavená a centrifugována na centrifuze MPW 300 s rotorem pro hematokrit CM-304 (2500 rpm, 5 min), po centrifugaci a odečtení výšky vzniklého sloupce krvinek byla stanovena koncentrace 25,7 % červených krvinek v suspenzi. Suspenze byla naředěná do výsledné koncentrace 0,4 % erythrocytů. Do první jamky hemaglutinační destičky bylo napipetováno 95 µl PBS s 0,2% BSA a 5 µl viru, do všech dalších jamek bylo napipetováno 50 µl PBS s 0,2% BSA. Z první jamky v řadě bylo odebráno 50 µl a přidáno k druhé jamce. Tento postup se opakoval až do konce dané řady. Do všech jamek bylo nakonec přidáno 50 µl krvinek o koncentraci 0,4 %. Hemaglutinační destička byla umístěna do lednice a inkubována přes noc. Další den došlo k odečtení hemaglutinačního testu (viz kap. 5.3).

4.2.3 Průtoková cytometrie

Buňky narostlé na petriho miskách o průměru 6 cm byly převedeny do suspenze trypsinizací a rozpuštěním v 3 ml sérového média, následně byly centrifugovány (1500 rpm, 8 minut). Pelet byl promyt resuspendováním v 3 ml PBS a centrifugován za stejných podmínek. Pelet byl resuspendován v 300 µl PBS, k suspenzi bylo přidáno 800 µl 96% ethanolu – ethanol byl k buňkám přidán po kapkách. Následovala inkubace 30 minut na ledu a centrifugace za stejných podmínek. Pelet byl resuspendován v 500 µl roztoku propidium jodidu o koncentraci 25 µg/ml a RNázy A o koncentraci 1 mg/ml. Po inkubaci v 37°C po dobu 30 minut mohlo proběhnout měření na průtokovém cytometru.

4.2.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

4.2.4.1 Příprava sondy pro *in situ* hybridizaci

Sonda byla připravená z plazmidu pBKV (viz kap. 4.1.5), obsahujícího genom BK viru. Sonda byla namířená proti BK virové DNA a byla připravená pomocí kitu BioNick™ Labeling System (Invitrogen). Nejprve byla připravená reakce obsahující:

- 1,5 µg plazmidu pBKV
- 5 µl 10x dNTP mixu
- 5 µl Enzyme mixu
- 38,5 µl destilované vody (do celkového objemu 50 µl)

Takto připravená směs byla promíchána a krátce zcentrifugována, dále následovala hodinová inkubace při 16 °C. K směsi bylo poté přidáno 5 µl Stop pufru. K 50 µl vzniklé směsi bylo přidáno:

- 50 µl 50% dextran sulfátu (konečná koncentrace 10%)
- 25 µl 20x SSC pufru (konečná koncentrace 2x)
- 125 µl deionizovaného formamidu (konečná koncentrace 50%)
- salmon sperm DNA (konečná koncentrace 10 ng/µl)

Takto připravená DNA sonda byla skladována při - 20°C.

4.2.4.2 Vlastní *in situ* hybridizace

Buňky narostlé na mikroskopických sklíčkách byly opláchnuty PBS. Následně byly buňky fixovány 30 minut v - 20°C ledově vychlazenou směsí methanolu a kyseliny octové v poměru 3:1. Buňky byly po fixaci 3x opláchnuty PBS a byla k nim přidána RNáza (konečná koncentrace 100 µg/ml), inkubace trvala 1 hodinu v 37°C. Po proplachu v PBS (2x) došlo k dehydrataci sklíček s buňkami vzestupnou koncentrační řadou ethanolu (50%, 70%, 80%, 96%), inkubace trvala vždy 2 minuty v každé koncentraci. Mikroskopické sklo

s buňkami bylo inkubováno na kapce 10 μ l (60 ng) DNA sondy a vloženo do PCR cyklieru, kde byl spuštěn program:

- 90 °C 2 min
- 80 °C 2 min
- 70 °C 2 min
- 60 °C 2 min
- 50 °C 2 min

Mezitím bylo do hybridizační komůrky vytemperované na 37°C kápnuto po stranách 6 μ l 2x SSC pufru. Po skončení programu v PCR cyklieru bylo podložní sklo okamžitě vloženo do hybridizační komůrky a inkubováno v 37°C přes noc. Další den byly buňky na krycím sklíčku promývány v kapkách (50 – 100 μ l) roztoků na parafilmu:

- 15 min na kapce 50% formamidu v 37°C
- 8 min na kapce 0,1% Tweenu 20 v 37°C
- 3x 4 min na kapce 0,1% Igepalu v 37°C
- 3x 2 – 3 min v 1x SSC pufru při pokojové teplotě
- 2x 2 – 3 min v PBS při pokojové teplotě.

Následně byla biotinylovaná DNA sonda značena metodou nepřímé imunofluorescence viz. kapitola 4.2.2.5 a 4.2.2.6.

4.2.5 Práce s proteiny

4.2.5.1 Příprava buněčných lyzátů

Z infikovaných buněk bylo odsáto médium a byly opláchnuty PBS. K buňkám na petriho misce o poloměru 6 cm bylo přidáno 200 μ l RIPA pufru a 0,2 μ l PMSF. Lyzát byl přenesen do zkumavky a inkubován 20 minut na ledu. Poté byl lyzát centrifugován 1 minutu na maximální otáčky. Supernatant byl přenesen do nové zkumavky a zmažen na – 20°C.

4.2.5.2 Příprava vzorků pro SDS polyakrylamidovou elektroforézu

Předem připravené buněčné lyzáty byly povařeny po dobu 10 minut s ¼ objemu Laemliho pufru 5x a krátce zcentrifugovány.

4.2.5.3 SDS polyakrylamidová elektroforéza

Aparatura pro proteinovou elektroforézu byla omyta, opláchnuta destilovanou vodou a lihem a ponechána na vzduchu do doby než vyschla. Poté byla aparatura sestavena, byl do ní nalit spodní 10% akrylamydový gel, který byl převrstven izobutanolem. Po ztuhnutí spodního gelu a odstranění izobutanolu byl nalit 5% horní gel, do kterého byly zasazeny hřebeny. Po polymeraci horního gelu byly odstraněny hřebeny a aparatura byla upevněna do elektroforezní vany. Gely byly přelity 1x koncentrovaným Running puforem a do jamek byly nanášeny vzorky Hamiltonovou jehlou. Elektroforéza běžela 30 minut při napětí 8 V/cm² (vputování vzorku do zaostřovacího gelu) a dále při napětí 14 V/cm² přibližně 2 hodiny, než čelo vzorků dosáhlo konce rozdělovacího gelu.

4.2.5.4 Fixace a barvení gelu

Gel byl fixován 1 hodinu ve fixačním roztoku. Následně byl opláchnut dvakrát v 3,5% HClO₄ a přemístěn do barvicího roztoku, barvení probíhalo přes noc při laboratorní teplotě. Následně byla přebytečná barva odmyta několikrát destilovanou vodou.

4.2.5.5 Western blotting

Rozdělovací část akrylamidového gelu byla po elektroforéze vyjmuta z aparatury a byla položena do blotovací aparatury směrem od anody ke katodě na jeden papír Whatman a tři filtrační papíry, na gel byla položena nitrocelulózová membrána, tři filtrační papíry a jeden Whatman papír. Takto sestavený blotovací sendvič byl umístěn do blotovací aparatury pro polosuché blotování, kde bylo dostatečné množství blotovacího pufru. Blotování probíhalo 1 hodinu a 30 minut při $0,8 \text{ mA/cm}^2$. V případě klasického blotování procedura probíhala 3 hodiny na ledu při napětí 250 mA a 100V, za stálého míchání blotovacího pufru.

4.2.5.6 Dot blot

Předem připravené vzorky (proteinové lyzáty nebo frakce viru) byly nakapány na nitrocelulózovou membránu a ponechány na vzduchu uschnout. V případě frakce viru bylo na membránu nanášeno množství o objemu 1 μl , v případě proteinových lyzátů takový objem, aby množství proteinů u všech vzorků bylo stejné.

4.2.5.7 Imunologická detekce proteinů imobilizovaných na nitrocelulózové membráně

Nitrocelulózová membrána byla blokována v roztoku 5% odtučněného mléka po dobu minimálně 1 hodiny při laboratorní teplotě, nebo přes noc při 4°C . Tímto postupem došlo k vysycení membrány a dále bylo umožněna pouze specifická detekce proteinů. Membrána byla inkubována v primární protilátce naředěné v blokačním roztoku po dobu minimálně 1 hodiny při laboratorní teplotě, nebo přes noc při 4°C . Primární protilátka byla odmyta 3x po 10 minutách roztokem PBS. Následovala inkubace se sekundární protilátkou (konjugovaná s křenovou peroxidázou) naředěnou v blokačním roztoku po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Po této inkubaci byla sekundární protilátka

odmyta 3x po 10 minutách roztokem PBS. Membrána byla dále inkubována v temné komoře s roztokem luminolu po dobu 30 sekund a položena na rentgenový film ve vyvolávací kazetě. Expoziční doby se pohybovaly od 30 sekund do 20 minut. Poté byl film vložen do roztoku vývojky a následně do ustalovače. Film byl poté dobře opláchnut destilovanou vodou a ponechán na vzduchu pro úplné uschnutí.

4.2.5.8 Stanovení koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Množství proteinů bylo měřeno u buněčných lyzátů v RIPA pufru, z tohoto důvodu se část každého vzorku naředila 10x v roztoku 0,15 M NaCl. K 20 μ l této směsi byl přidán 1 ml Bradfordové činidla. Po promíchání směsi a krátké inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance všech vzorků při vlnové délce 595 nm.

Pro vypočítání koncentrace proteinů v daném vzorku bylo nutné připravit kalibrační křivku standardních roztoků o koncentraci (viz tab. 4.1). K 20 μ l z každého ze standardních roztoků byl přidán 1 ml Bradfordové činidla. Po promíchání směsi a krátké inkubaci při laboratorní teplotě byla změřena absorbance všech standardů při vlnové délce 595 nm. Z naměřených hodnot byla vytvořena kalibrační křivka.

standard	množství NaCl v μ l	množství BSA v μ l
1.	1000	0
2.	750	250
3.	500	500
4.	250	750
5.	0	1000

Tabulka 4.1 Standardní roztoky pro naměření kalibrační křivky

4.2.6 Práce s RNA

4.2.6.1 Izolace celkové RNA High Pure Isolation Kit (Roche)

Synchronizované HRPTE buňky porostlé na petriho miskách o průměru 6 cm byly infikovány s multiplicitou infekce 5. Buňky byly ztrypsinovány a centrifugovány (5 minut, 1500 rpm), buněčný pelet byl promyt 200 µl PBS a znovu centrifugován za stejných podmínek. Pelet byl zlyzován 400 µl Lysis-Binding Buffer a vortexován 15 sekund. Vzniklý lyzát byl přenesen do kolonky a centrifugován (15 sekund, 8000g), do kolonky bylo přidáno 90 µl Dnase Incubation Buffer a 10 µl Dnase I mix, následovala inkubace 15 minut při laboratorní teplotě. Do kolonky bylo přidáno 500 µl Wash Buffer I a po centrifugaci (15 sekund, 8000g) byla kolonka promyta 500 µl Wash Buffer II a opětovně 200 µl Wash Buffer I. Po každém promytí následovala centrifugace za stejných podmínek. RNA byla eluována z kolonky do nové sterilní zkumavky přidáním 50 µl Elution Buffer a centrifugací (1 minuta, 8000 g). Takto připravená RNA byla uchovávána při - 80°C.

4.2.6.2 Příprava cDNA kitem iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO RAD)

Reakce byla připravená do celkového objemu 20µl a obsahovala:

- 4 µl 5x iScript Reaction Mix
- 1 µl iScript Reverse Transcriptase
- 1 µl templátové RNA (300 ng)
- 14 µl Nuclease – free water

Reakce byla inkubována:

- 5 minut v 25°C
- 30 minut v 42°C
- 5 minut v 85°C
- uchovávání v -20°C

4.2.7 Práce s DNA

4.2.7.1 Agarózová elektroforéza

Používané agarózové gely byly o koncentraci 0,8 až 1 %. Vypočítané množství agarózy bylo považením rozpuštěno v 0,5x koncentrovaném TBE pufru. Po částečném vychladnutí byl k agaróze přidán ethidium bromid o konečné koncentraci 0,5 µg/ml a směs byla nalita do elektroforetické vaničky. Po ztuhnutí agarózového gelu byla vanička umístěna do elektroforetické aparatury a přelita 0,5x koncentrovaným TBE puforem. Do jamek byl napipetován vzorek předem smíchaný s puforem 6x Orange DNA Loading Dye (Fermentas). Elektroforéza probíhala při stejnosměrném proudu 5 V/cm. Po skončení byl gel vyfocen pod UV transluminátorem.

4.2.7.2 Izolace DNA Hirtovu metodou

Infikované buňky rostoucí na petriho miskách byly převedeny do suspenze trypsinizací, následně byla směs centrifugována (1500 rpm, 10minut, 4°C). Sediment byl resuspendován v 10 ml PBS a znova zcentrifugován (1500 rpm, 10minut, 4°C). Vzniklý sediment byl resuspendován v 2 ml Hirtova roztoku. Směs byla inkubována 10 minut při laboratorní teplotě, poté bylo k směsi přidáno 500 µl 5M NaCl (tak, aby výsledná koncentrace NaCl byla 1M). Následovala inkubace při 4°C přes noc. Druhý den byla směs centrifugována (30 minut, 4300 rpm, 4°C). K vzniklému supernatantu byla přidána proteináza K, o výsledné koncentraci 0,125 mg/ml, následovala inkubace po dobu 2 hodin při 50°C. Po skončení inkubační doby byl ke vzorku přidán 1x objem fenolu, následovalo promíchání a centrifugace (8 000 g, 10 minut, 4°C). Horní vodní fáze byla přenesena do nové zkumavky. K fenolové fázi byl přidán 0,5x objem TE purfu (pH=7,4), následovalo promíchání a centrifugace (8 000 g, 10 minut, 4°C). Vodní fáze byla spojena s vodní fází vzniklou v předešlém kroku, k této směsi byl přidán 2x objem chloroformu, následovalo promíchání a centrifugace (8000 g, 10 minut, 4°C). K vodní fázi byl přidán 2,5x objem ledově vychlazeného 96% ethanolu. Směs byla promíchána a DNA precipitována přes

noc při teplotě - 20°C. Druhý den byla směs centrifugována (20 000g, 30 minut, 4°C), vzniklý supernatant byl odstraněn a pelet obsahující DNA promyt 1 ml 70% ethanolem. Následovala centrifugace (20 000g, 30 minut, 4°C). Supernatant byl odstraněn a pelet byl ponechán na vzduchu při laboratorní teplotě k dokonalému uschnutí. Pelet byl poté resuspendován v 10 µl sterilní demineralizované H₂O.

4.2.7.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Amplifikace fragmentů DNA probíhala v objemech reakcí 20 µl nebo 50 µl, které obsahovaly:

- 5 µl reakčního pufru ThermoPol 10x
- 1,5 µl primeru 1
- 1,5 µl primeru 2
- 1 µl dNTP 10 mM
- 0,5 µl Vent polymerázy
- 1 µl templátové DNA (o přibližné koncentraci 100 ng/µl)
- 39,5 µl dd H₂O (doplnění do objemu 50 µl)

Pro amplifikaci byl použit následující teplotní sled: 35 cyklů

- 94°C 3 minuty (počáteční denaturace)
- 94°C 40 sekund (denaturace)
- 60°C 50 sekund (nasedání primerů)
- 72°C 1 minuta (polymerace)
- 72°C 7 minut (závěrečná elongace)
- 4°C konečná teplota

4.2.7.4 Kvantitativní *real time* PCR

Reakce probíhala na přístroji LightCycler® 480 Instrument II, 384well block (ROCHE), za použití kitu LightCycler® 480 DNA SYBR Green I Master. Amplifikace fragmentů cDNA probíhala v objemech reakcí 10 µl které obsahovaly:

- 5 µl SYBR Green reaction mix
- 0,25 µl primeru 1
- 0,25 µl primeru 2
- 4,5 µl H₂O PCR – grade

Pro amplifikaci byl použit následující teplotní sled: 40 cyklů

- 95°C 5 minut (preinkubace)
- 95°C 10 sekund (denaturace)
- 55°C 10 sekund (nasedání primerů)
- 72°C 15 sekund (polymerace)
- 40°C konečná teplota

4.2.7.5 Vizualizace replikačních ložisek

Pro vizualizaci ložisek replikující se DNA v jádrech buněk infikovaných BKV byl použit analog thymidinu, 5-ethynyl-2-deoxyuridin (EDU) (Invitrogen). K buňkám, pěstovaným na sklíčkách bylo přidáno 200 µl, 10 µM EDU po dobu 30 minut. Poté byly buňky několikrát opláchnuty sérovým médiem, fixovány (viz kap. 4.2.2.5) a imunofluorescenčně značeny protilátkami namířenými proti BKV VP1 proteinu a PLM proteinu (viz kap. 4.2.2.6). Replikační ložiska byla vizualizována pomocí Edu Alexa Fluor® 594 Imaging Kit (Invitrogen).

5. VÝSLEDKY

5.1 Ověření negativity HRPTE buněk na BK virus

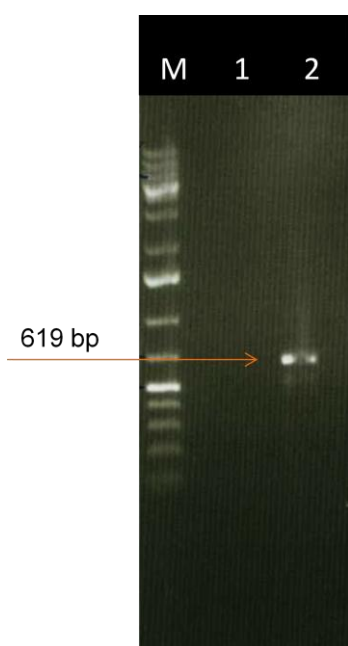
Lidské primární buňky z proximálních tubulů ledvin (HRPTE) byly před začátkem vlastních experimentů testovány na přítomnost BK viru. Buněčná konzerva byla opracována viz kapitola 4.2.1.1. Buněčná DNA byla izolována Hirtovou metodou viz 4.2.5.2 a použita k PCR reakci s primery specifickými pro BK virový VP1 protein viz 4.1.7. Výsledek ukazuje na nepřítomnost BK virové DNA v používané buněčné linii. Jako kontrola průběhu PCR reakce byla použita DNA z buněk infikovaných příbuzným virem SV40 s příslušnými primery (viz obr. 5.1).



Obrázek 5.1 Elektroforetická analýza PCR reakce. Vzorek nanesený v 1. jamce je výsledkem reakce s amplifikací části genu pro VP1 specifické pro BK virus. Zde byl použit primer specifický pro VP1 protein viru BK a primer společný pro část VP1 genu shodnou u BK a SV40 viru. V jamce číslo 2 je výsledek PCR reakce pro amplifikaci části genu pro VP1 specifické pro SV40 virus, zde byl použit primer specifický pro VP1 genu viru SV40 a primer společný pro část VP1 genu shodnou u BK a SV40 viru.

5.2 Ověření infekitivity BKV na HRPTE buňkách

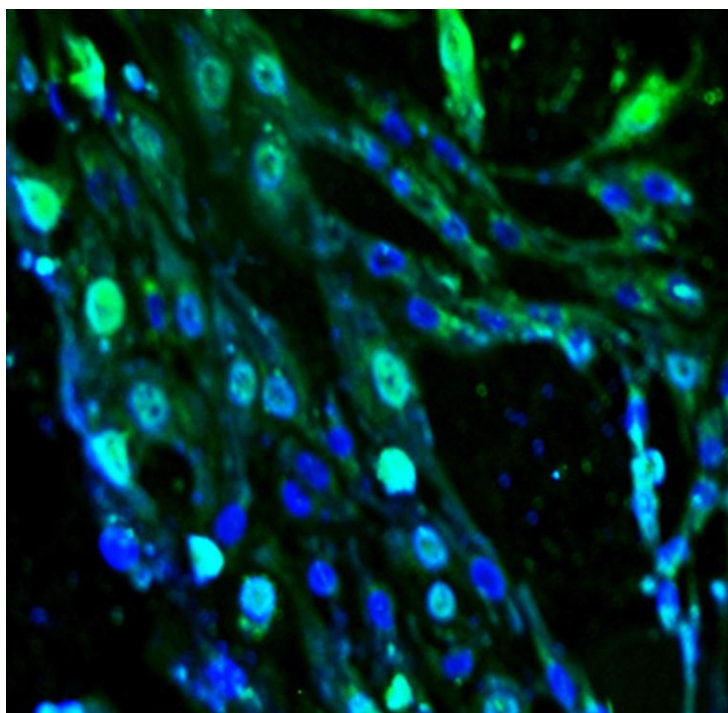
Ověřené HRPTE buňky byly infikovány s nízkou multiplicitou infekce ($MOI=0,1$), po sedmi dnech infekce byla z buněk izolovaná DNA Hirtovou metodou viz. 4.2.5.2. Takto izolovaná DNA byla použita jako templát pro PCR reakci s primery specifickými pro LT antigen BK viru, viz 4.1.7.



Obrázek 5.2 Elektroforetická analýza PCR reakce. Jako negativní kontrola PCR reakce byla použita PCR reakční směs bez templátu, tato kontrola byla nanášena v jamce číslo 1. V 2. jamce byl nanášen vzorek s templátem (DNA izolovaná z infikovaných HRPTE buněk). Velikost amplifikovaného fragmentu odpovídá amplifikované části genu pro LT antigen BK viru.

5.3 Izolace BK viru

Pro studium životního cyklu BK viru bylo nutné virus nejprve namnožit. K tomuto účelu byly použity primární lidské buňky z renálních proximálních tubulů ledvin. Tyto buňky byly pěstovány na Petriho miskách o průměru 10 cm až do doby kdy dosáhly 75% konfluence. Následně byly infikovány virem o nízké multiplicitě ($MOI = 0,1$) a byly pěstovány 7 dní v inkubátoru pro savčí buňky. Průběh infekce byl sledován imunofluorescenčním značením kontrolních sklíček přítomných v miskách (viz obr. 5.3) a imunologicky dot blotem (viz obr. 5.4). Kontrola prokázala přítomnost hlavního kapsidového proteinu VP1, v této době infekce (7 dpi), v buněčném jádře i v cytoplasmě.



Obrázek 5.3 Imunologická detekce BKV VP1 proteinu (zeleně). Jádra buněk jsou značena DAPI (modře). Ověření infekce po 7 dnech, VP1 protein je přítomný jak v jádře, tak v cytoplasmě. K detekci VP1 proteinu byla použita primární polyklonální králičí protilátka proti BKV VP1 a sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AlexaFluor 488. Zvětšeno 400x.



Obrázek 5.4 Detekce VP1 proteinu k ověření infekce BK virem. Buněčné lyzáty byly připraveny z infikovaných i neinfikovaných buněk. Z každého lyzátu bylo na nitrocelulózovou membránu naneseno 2 a 5 µl. U buněčných lyzátů z infikovaných buněk je patrný signál VP1 proteinu, narozdíl od neinfikovaných buněk, kde je signál na úrovni odpovídající pozadí použité protilátky. Pro detekci byla použita primární polyklonální králičí protilátka proti VP1 proteinu a sekundární protilátka proti králičím imunoglobulinům konjugovaná s AlexaFluor 488.

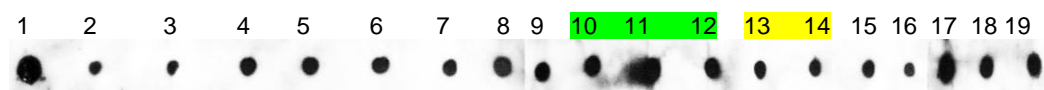
Poté byly buňky seškrabány z misek a společně s médiem zmrazeny na - 70°C. Podrobný postup izolace viru je popsán v kapitole 4.2.2 a byl u všech prováděných izolací vždy stejný. Po purifikaci viru v CsCl gradientu, byly frakce viru rozděleny dle refraktometrického indexu (viz tab. 5.1).

	Gradient I.	Gradient II.
1.	1,377	1,356
2.	1,378	1,379
3.	1,376	1,381
4.	1,374	1,379
5.	1,372	1,377
6.	1,371	1,375
7.	1,370	1,373
8.	1,369	1,371
9.	1,368	1,369
10.	1,3665	1,368
11.	1,365	1,367
12.	1,364	1,365
13.	1,3625	1,364
14.	1,362	1,363
15.	1,360	1,362
16.	1,359	1,360
17.	1,357	1,359
18.	1,357	1,357
19.	1,356	1,356

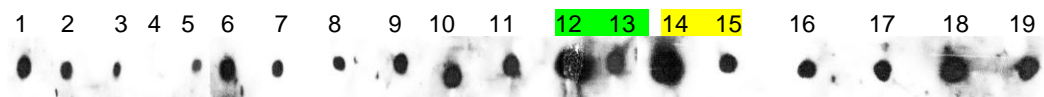
Tabulka 5.1 Naměřené refraktometrické indexy. Zeleně jsou označeny frakce obsahující plné viriony a žlutě jsou označeny frakce s prázdnými viriony.

Dále byla provedena imunologická detekce VP1 proteinu v každé z jednotlivých frakcí (viz obr. 5.5). Gradient koncentrace detekovaného VP1 proteinu však nebyl při tomto způsobu detekce dostatečně zřetelný, proto k rozdělení na frakci plných a prázdných virionů došlo především podle změřených refraktometrických indexů. Z obou frakcí byly zhotoveny elektronmikroskopické snímky, potvrzující celistvost virionů (viz obr. 5.6).

Gradient I.

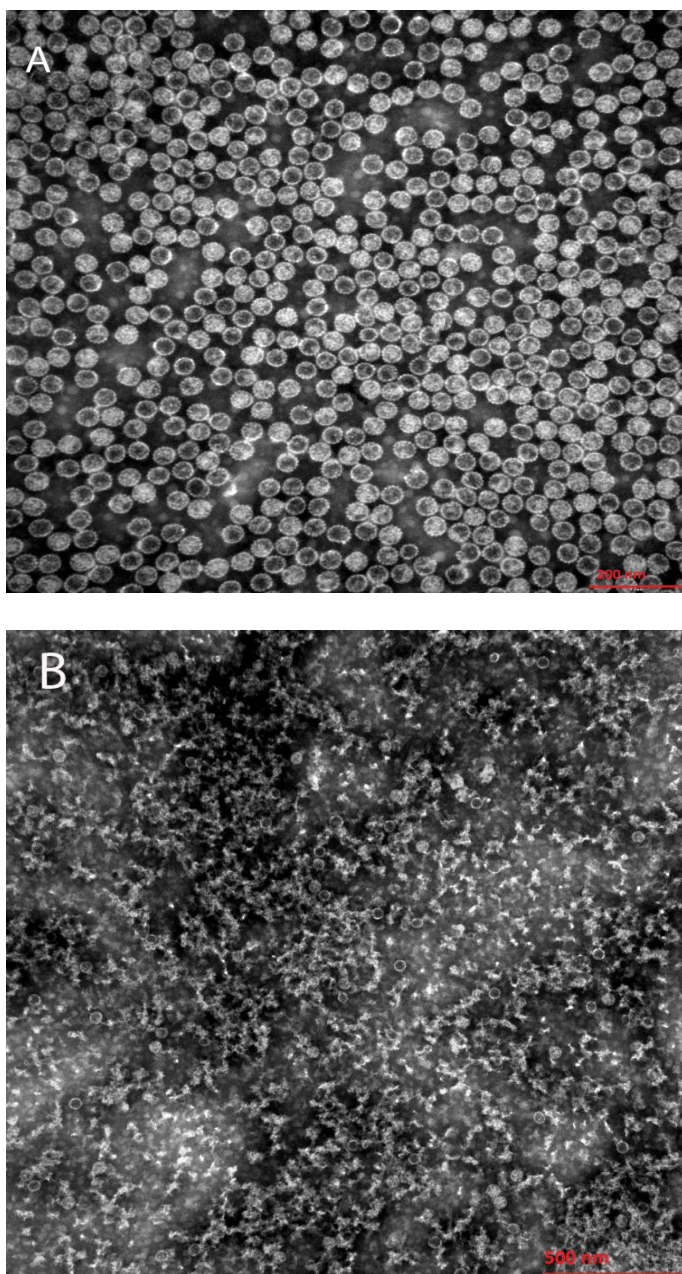


Gradient II.

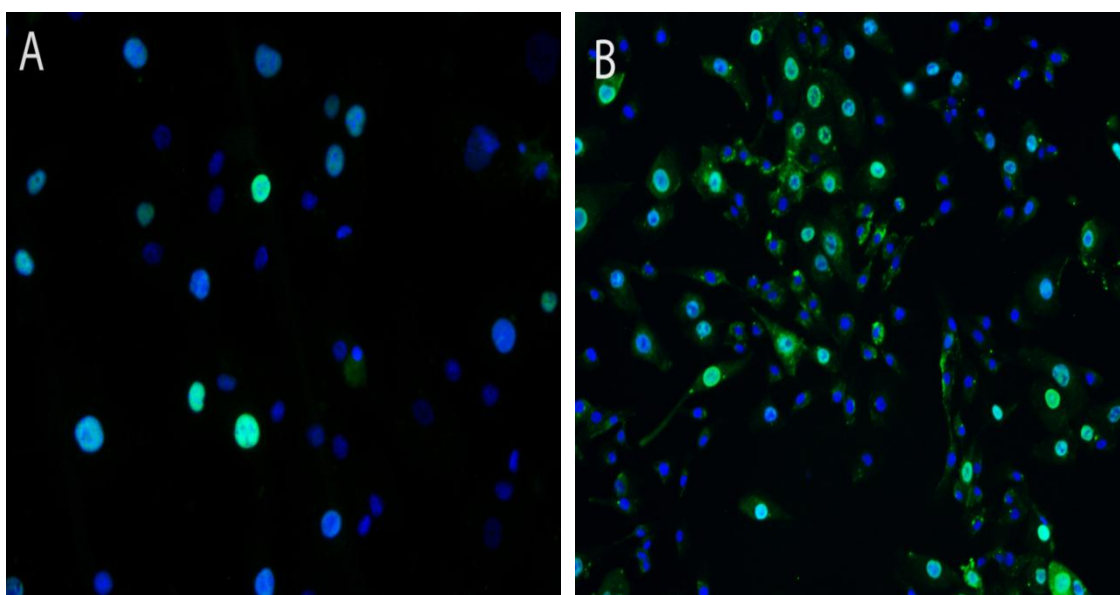


Obrázek 5.5 Imunologická detekce VP1 proteinu v jednotlivých frakcích z obou gradientů. Zeleně jsou označeny frakce, které (dle refraktometrických indexů) obsahovaly plné virové částice. Žlutě jsou označeny frakce o nižších refraktometrických indexech obsahující prázdné viriony. Na nitrocelulózovou membránu byl nanesen 1 µl suspenze z každé frakce, VP1 protein byl detekován králičí polyklonální protilátkou proti BK VP1 a sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou.

Dále bylo nutné zjistit virový titr. To bylo provedeno imunofluorescenčně (viz kap. 4.2.2.6) Infikované a obarvené buňky byly vyfoceny (viz obr. 5.7) a byl spočítán virový titr (viz tabulka 5.2).



Obrázek 5.6 Elektronmikroskopické snímky vyizolovaného BK viru. (A) Frakce s převažujícími plnými viriony. (B) Frakce prázdných virionů, v této frakci se navíc objevovalo i více nečistot. Virus byl barven metodou negativního barvení. (Elektronmikroskopické snímky zhotovil Mgr. Vojtěch Žíla).



Obrázek 5.7 Imunofluorescenční snímky HRPTE buněk infikovaných BKV. Infikované buňky byly zafixovány 48 hodin po infekci a značeny primárními myšími protilátkami proti LT antigenu nebo králičími protilátkami proti VP1 proteinu BK viru. Zviditelnění primárních protilátek navázaných na antigenech bylo provedeno sekundární protilátkou namířenou proti králičím nebo myším imunoglobulinům konjugovanou s AlexaFluor488. (A) Velký T antigen v buněčném jádře (zelený signál), zvětšeno 400x. (B) VP1 protein v buněčném jádře i v cytoplasmě (zelený signál), zvětšeno 200x. Jádra buněk byla v obou případech zviditelněná vazbou DAPI (modrý signál) na buněčnou DNA.

U izolace viru byl vždy zjišťován i hemaglutinační titr, tedy absolutní počet všech virových partikulí. Tento test je založen na schopnosti BK viru aglutinovat lidské červené krvinky skupiny 0 (Mäntyjärvi et al., 1972). Hemaglutinační test byl proveden v duplikátech jak u frakce plných, tak i frakce prázdných virionů. K hemaglutinaci docházelo u obou izolovaných frakcí viru.

Z výsledků imunofluorescence a hemaglutinačního testu byl stanoven titr viru. V případě imunofluorescence se jedná o infekční titr viru (určeno pouze u frakce plných virionů) a v případě hemaglutinačního testu o celkový počet virových částic (viz tabulka 5.2).

frakce	Imunofluorescenční titr FFU	Hemaglutinační titr
plné viriony	$1,8 \cdot 10^8$	$1,97 \cdot 10^{11}$
prázdné viriony	-	$7,68 \cdot 10^8$

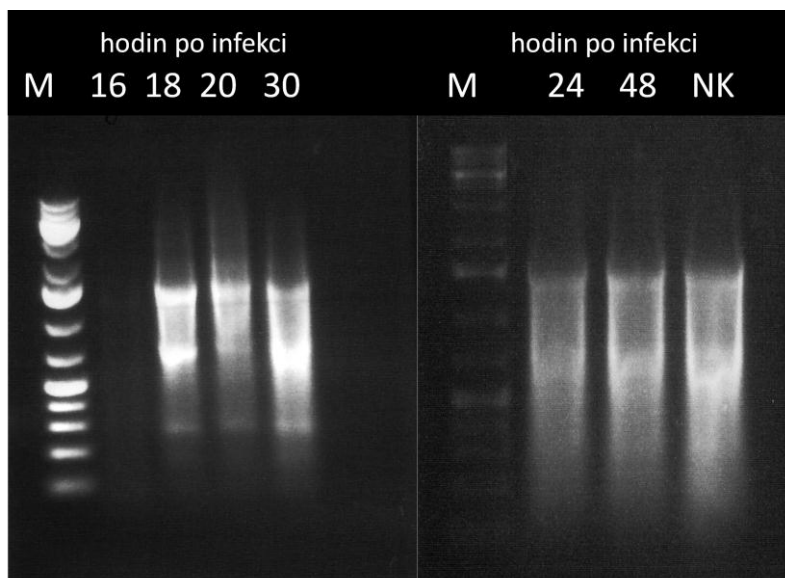
Tabulka 5.2 Určení virového titru. Infekční titr je uveden u frakce plných virionů jako počet „fluorescent forming units“ na 1 ml virové suspenze. Hemaglutinační titr je uveden jako počet všech částic viru na 1 ml virové suspenze u obou frakcí.

5.4 Izolace RNA z infikovaných buněk

Pro účely dalšího studia BK viru bylo nutné izolovat celkovou RNA z infikovaných buněk. Buňky byly synchronizovány a infikovány virem s multiplicitou infekce 5. V různých časech po infekci (16 hpi, 18 hpi, 20 hpi, 24 hpi, 30 hpi, 48 hpi) byly infikované buňky zlyzovány a byla izolována celková RNA (viz kap. 4.2.4.1). Kvalita a koncentrace vyizolované RNA byla zjišťována elektroforeticky (viz obr. 5.8, tabulka 5.3). Izolace RNA proběhla úspěšně u všech vzorků s výjimkou izolace v 16 hodinách po infekci, kde byla detekovaná pouze nízká koncentrace RNA i přes to byl vzorek použitelný pro další experimenty. Hodnoty poměru absorpance ($A_{260/280}$, viz tab. 5.3) změřené u všech vzorků byly vyhovující, což vypovídá o dobré čistotě vyizolované RNA.

Z takto připravené RNA byla vyrobena cDNA dle „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ od firmy BIO RAD. Abychom dále ověřili kvalitu vzniklé cDNA a ověřili funkčnost primerů pro pozdější kvantitativní analýzu real time PCR, zkusili jsme ve získané cDNA detekovat jednotlivé časné a pozdní virové produkty (viz obr. 5.9 a 5.10). Při detekci genu pro VP1 BKV za použití specifických primerů (viz kap.4.1.6) byla přítomnost VP1 mRNA potvrzena ve vzorcích v 24 a 48 hodinách po infekci. Pro detekci genu pro VP2 byly použity primery specifické pro jedinečnou část VP2 proteinu BK viru, přítomnost

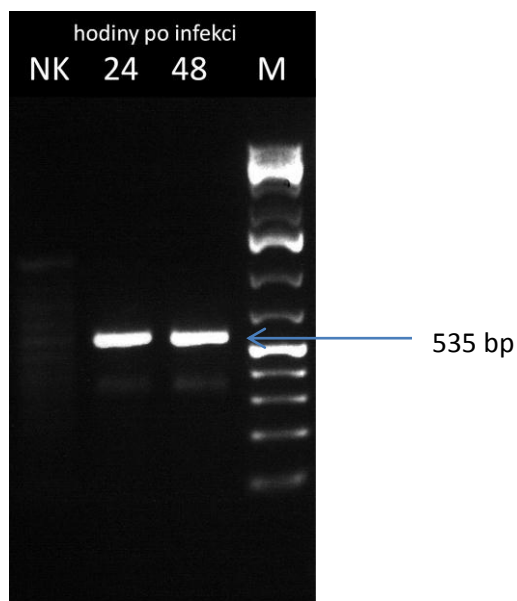
specifické mRNA byla prokázána ve vzorku 48 hodin po infekci. Stejně byl detekována i mRNA pro LT antigen v 48 hodinách po infekci.



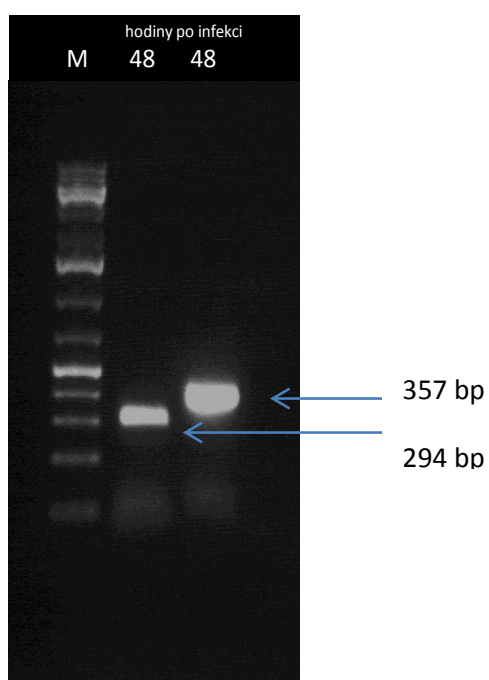
Obrázek 5.8 Elektroforetická analýza vyizolované celkové RNA z infikovaných buněk. U všech vzorků s výjimkou izolace v 16 hodinách po infekci jsou na gelu vždy pozorovatelné různé formy RNA, kde nejvýše je rRNA, níže je tRNA následovaná mRNA. Virová RNA není v celkovém množství buněčné RNA rozlišitelná. U vzorku izolovaného 16 hodin po infekci pravděpodobně došlo k částečné degradaci RNA.

hodiny po infekci	koncentrace ng/μl	poměr absorbance 260/280	poměr absorbance 260/230
16	41,1	2,07	2,13
18	285,7	2,08	2,29
20	233,7	2,10	2,20
24	305,2	2,08	2,26
30	300,2	2,04	2,28
48	331,6	2,05	2,22
NK	355,2	2,04	2,22

Tabulka 5.3 Koncentrace a čistota vyizolované celkové RNA z infikovaných buněk.



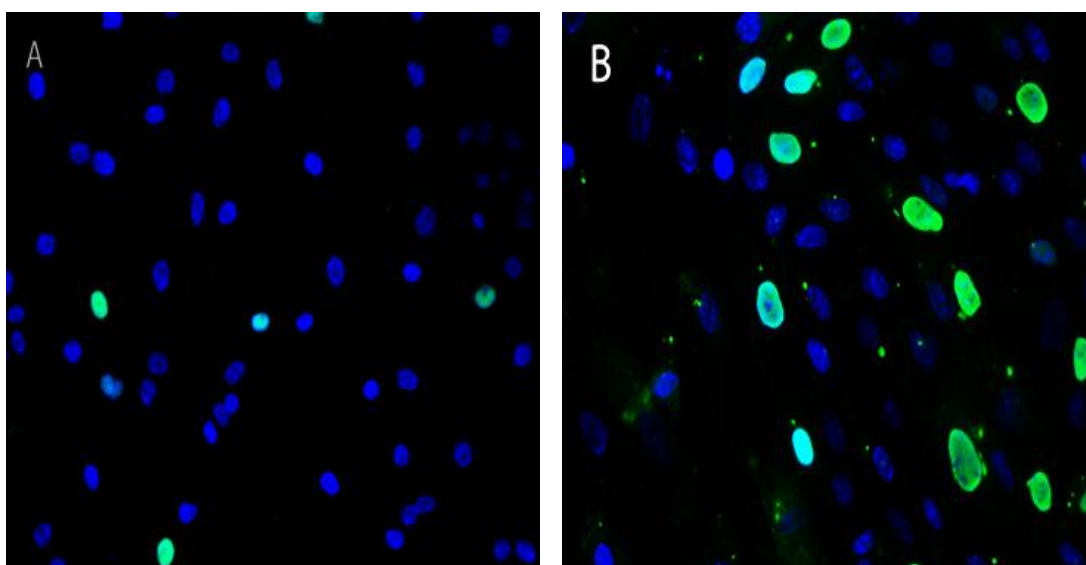
Obrázek 5.9 Elektroforetická kontrola po provedené PCR. V 24 a 48 hodinách po infekci detekována mRNA (resp. cDNA) části genu pro VP1 protein o velikosti 535 bp, jako negativní kontrola označena PCR reakce s templátem cDNA z neinfikovaných buněk.



Obrázek 5.10 Elektroforetická kontrola po provedené PCR. V 48 hodinách po infekci detekovány mRNA (resp. cDNA) části genů pro VP2 protein o velikosti 357 bp a pro LT antigen o velikosti 294 bp.

5.5 Určení času exprese virových proteinů

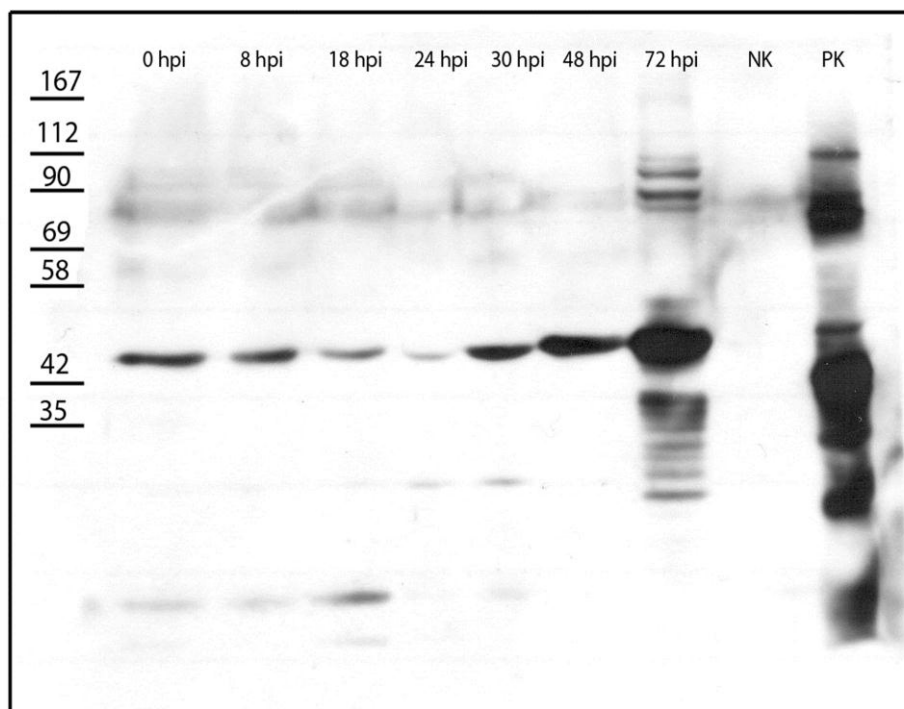
Dalším krokem v studiu životního cyklu viru bylo určení časů kdy dochází k expresi virových proteinů. Tyto časy byly určovány několika způsoby. Nejprve se exprese časných a pozdních proteinů určovala imunofluorescenčně. Synchronizované buňky HRPTE byly infikovány s multiplicitou 5 a následně byly fixovány a obarveny v různých časech po infekci. První detekce velkého T antigenu byla možná touto metodou 12 hpi, první detekce VP1 proteinu byla 30 hpi (viz obr. 5.11).



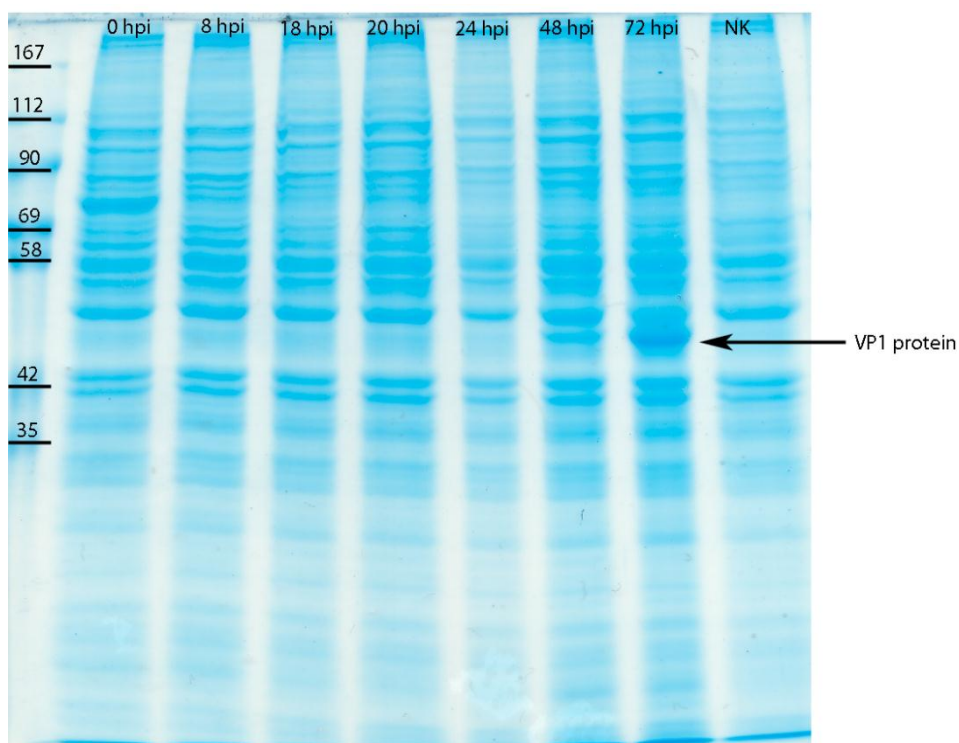
Obrázek 5.11 Imunofluorescenční snímky HRPTE buněk infikovaných BK virem za účelem určení míry exprese virových proteinů v různých časech po infekci. První detekce LT antigenu byla možná u buněk 12 hodin po infekci (A) HRPTE 12 hpi - LT protein BKV (zeleně), jádra buněk barvena DAPI (modře), zvětšeno 200x. První detekce *de novo* vznikajícího VP1 proteinu v buněčném jádře byla možná u buněk 30 hodin po infekci (B) HRPTE 30 hpi - VP1 protein BKV (zeleně), jádra buněk barvena DAPI (modře), zvětšeno 400x. Byla použita králičí polyklonální protilátka proti VP1 proteinu BK viru a myší monoklonální protilátka proti LT antigenu příbuzného SV40 viru. Jako sekundární protilátka byla použita protilátka proti králičím nebo myším imunoglobulinům konjugovaná s AlexaFluor 488.

Další metodou pro určení časové škály exprese virových proteinů byla proteinová elektroforéza buněčných lyzátů, získaných ze synchronizovaných a infikovaných buněk v různých časech po infekci. U těchto lyzátů bylo změřeno množství proteinů a pro elektroforetickou analýzu bylo vždy použito stejné množství proteinů. Výsledkem této analýzy je Western blot a gel obarvený Comassie Brilliant Blue (viz obrázky 5.12 a 5.13). První detekce VP1 proteinu je i u této metody možná v buněčném lyzátu získaném v 30 hodinách po infekci. V dalších časech 48 a 72 hodin po infekci množství VP1 proteinu roste. V časech před 30 hodinami po infekci také pozorujeme signál odpovídající VP1 proteinu, což je pravděpodobně způsobeno residuem VP1 pocházejícího ze vstupujícího viru. U gelu obarveného Comassie Brilliant Blue byla možná detekce VP1 proteinu až v 48 hodinách po infekci, což je pravděpodobně způsobeno nižší detekční schopností této metody oproti imunoznačení.

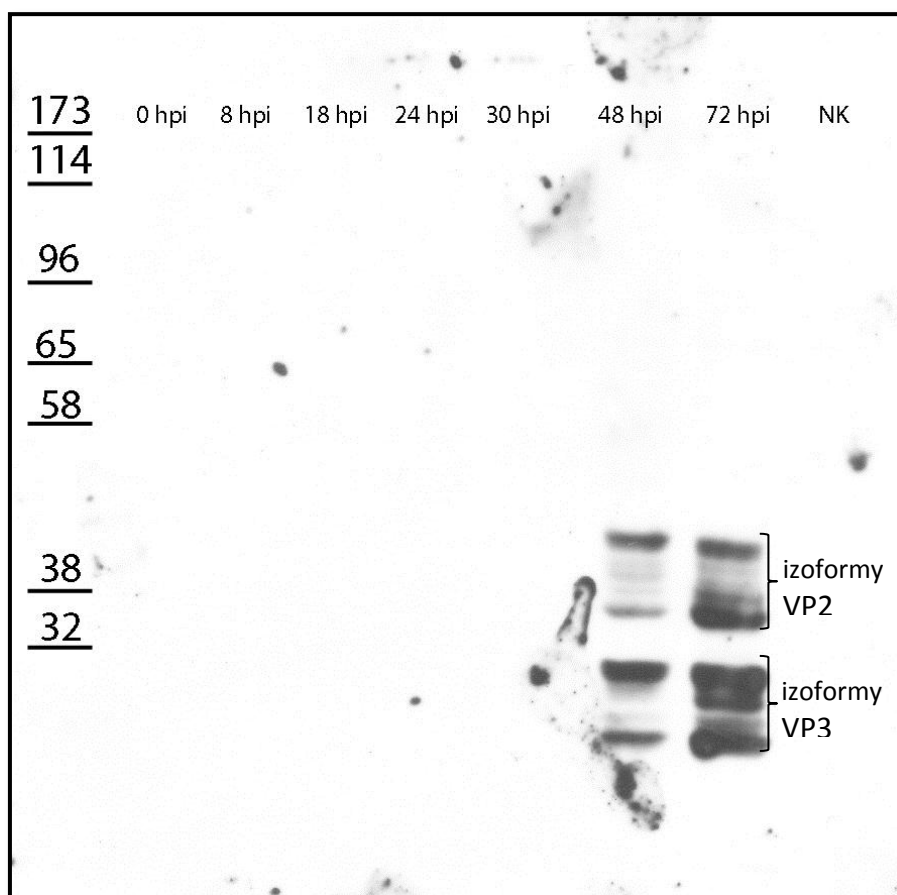
Další pozdní virové proteiny VP2 a VP3 byly detekovány stejným postupem. Průkaz přítomnosti těchto virových produktů je možný nejdříve v 48 hpi (viz obr. 5.14). Množství VP2 a VP3 se zvyšovalo s postupující infekcí, ale nárůst nebyl tak signifikantní v porovnání s hlavním strukturním proteinem. Pozdější detekce minoritních proteinů je pravděpodobně způsobena jejich nižším zastoupením ve virionu. To je také důvodem proč nejsou detekovatelné ve zbytkovém množství v časech rané infekce, jako je tomu u VP1.



Obrázek 5.12 Western blot po imunologické detekci VP1 proteinu. V jednotlivých sloupcích jsou naneseny lyzáty HRPTE buněk v různých časech po infekci (0, 8, 18, 24, 30, 48, 72 hpi). Jako pozitivní kontrola byl použit lyzát buněk Sf9 infikovaných bakulovirem exprimujícím VP1 protein BK viru (na obrázku značeno jako PK). Pro negativní kontrolu byl nanesen lyzát z neinfikovaných buněk (na obrázku značeno jako NK). Detekce byla prováděná primární polyklonální králičí protilátkou proti BKV VP1 a následně sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou.



Obrázek 5.13 Gel obarvený Comassie Brilliant Blue. V jednotlivých sloupcích jsou naneseny lyzáty HRPTE buněk v různých časech po infekci (0, 8, 18, 24, 30, 48, 72 hpi). Jako negativní kontrola byl nanesen lyzát z neinfikovaných buněk (na obrázku značeno jako NK). VP1 protein je na obrázku vyznačen šipkou.

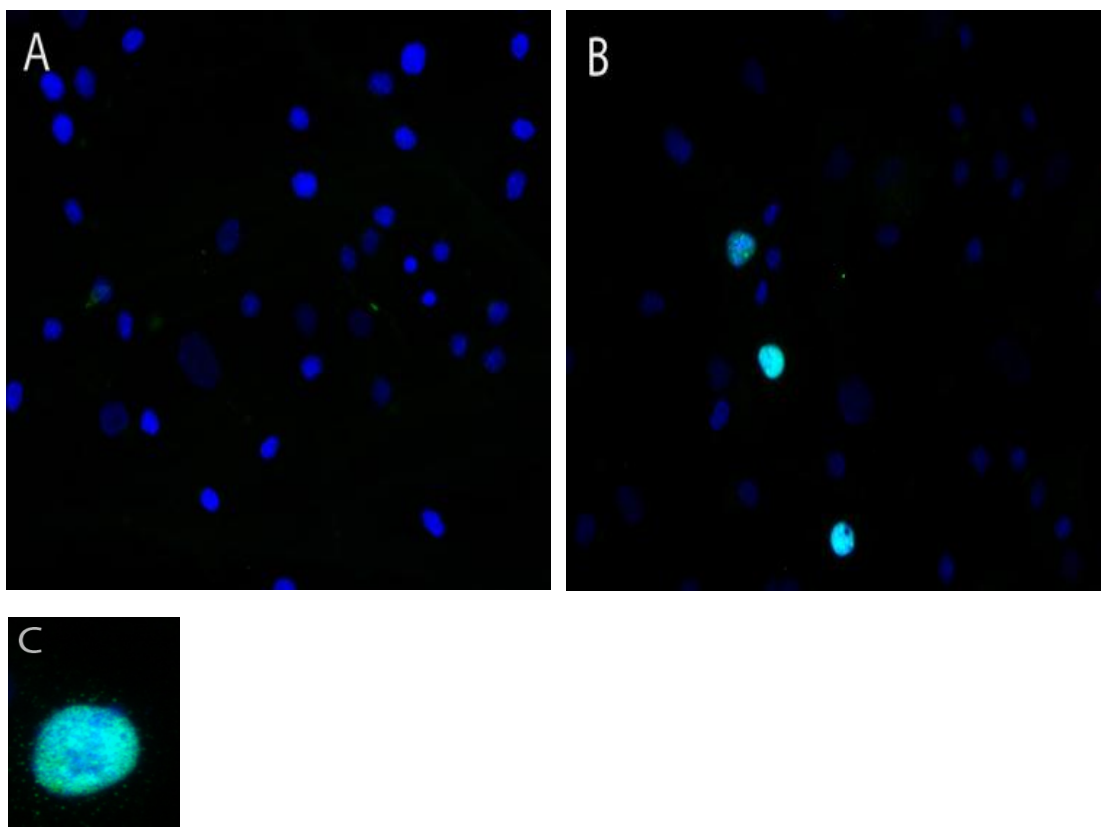


Obrázek 5.14 Western blot po imunologické detekci VP2/3 proteinu. V jednotlivých sloupcích jsou naneseny lyzáty HRPTE buněk v různých časech po infekci (0, 8, 18, 24, 30, 48, 72 hpi). Pro negativní kontrolu byl nanesen lyzát z neinfikovaných buněk (na obrázku značeno jako NK). Proteiny byly značeny primární myší protilátkou proti VP2/3 proteinu SV40 viru, u níž byla již dříve popsána křížová reaktivita s minoritními proteiny BKV a sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s křenovou peroxidázou.

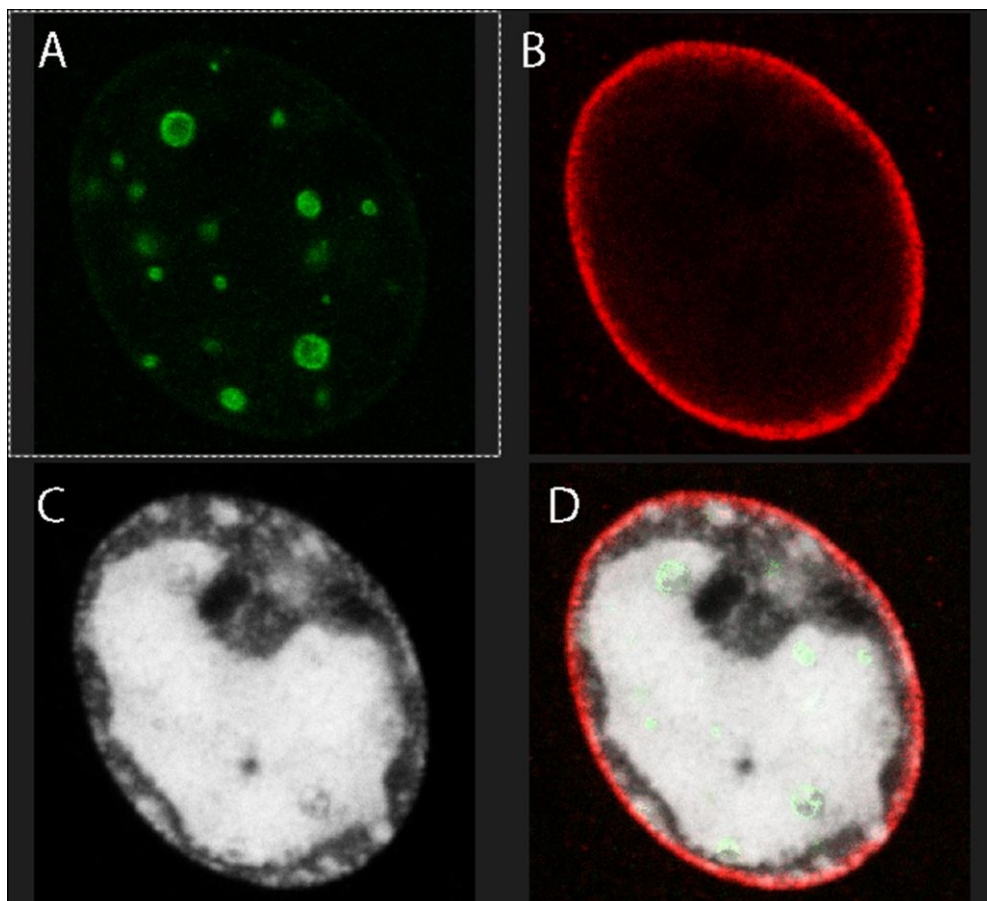
5.6 Určení začátku virové replikace

Další etapou ve výzkumu životního cyklu námi studovaného viru bylo určení času, kdy se začíná replikovat virová DNA v infikované hostitelské buňce. Pro zjištění začátku virové replikace byla použita metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Buňky byly synchronizovány a infikovány virem s multiplicitou 5. V různých časech po infekci byly buňky hybridizovány s biotinylovanou sondou rozpoznávající replikující se virovou DNA. Následně došlo k fixaci a fluorescenčnímu značení biotinu sekundární protilátkou namířenou proti biotinu AlexaFluor488. Výsledky tohoto experimentu byly vyhodnoceny a vyfoceny na imunofluorescenčním mikroskopu (viz obr. 5.15). Detekce biotinu a tedy i vizualizace replikující se virové DNA v infikované buňce byla touto metodou možná nejdříve v 24 hodinách po infekci.

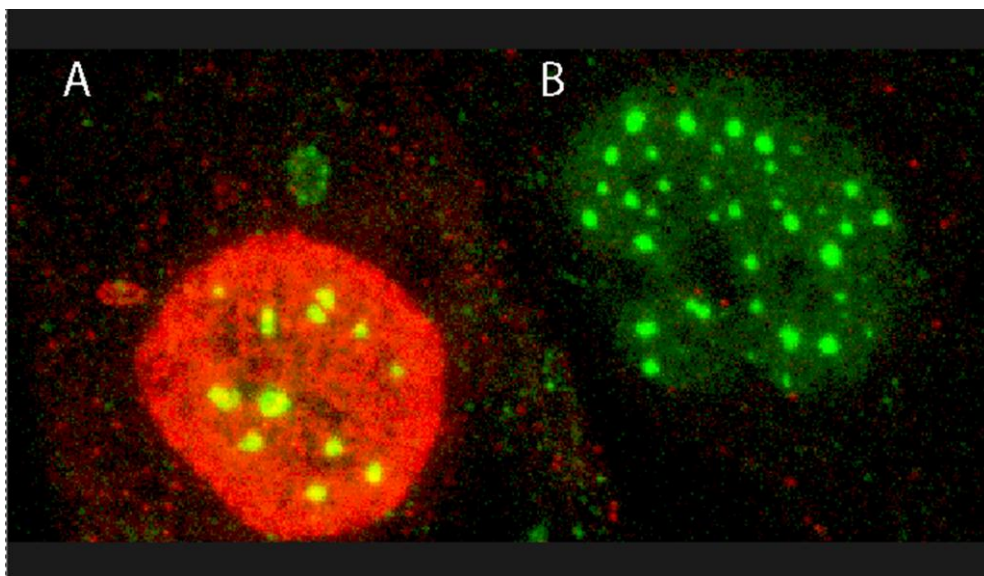
Virová replikace byla zkoumána i z hlediska změn, které navozuje v jádře hostitelské buňky. Z tohoto důvodu byla u infikovaných buněk (MOI=5; 48 hpi), označena replikující se DNA. Značení bylo provedeno thymidinovým analogem (5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)), který byl následně fluorescenčně označen. V buňkách byla současně provedena detekce VP1 proteinu a PML tělísek (viz obr. 5.16, 5.17). Buňky byly následně sledovány pomocí konfokálního mikroskopu.



Obrázek 5.15 HRPTE buňky infikované BK virem. (A) Buňky 18 hpi - u těchto buněk je pozorovatelná pouze modře obarvená (DAPI) buněčná DNA, zvětšeno 200x. (B) Buňky 24 hodin po infekci, zde vidíme signál biotinilované sondy (zeleně) na pozadí buněčné DNA (modře), což vypovídá o probíhající replikaci virové DNA (zeleně), zvětšeno 200x. (C) Detail buňky, kde probíhá replikace virové DNA v 24 hodinách po infekci, buněčná DNA zviditelněna modře, zvětšeno 400x.

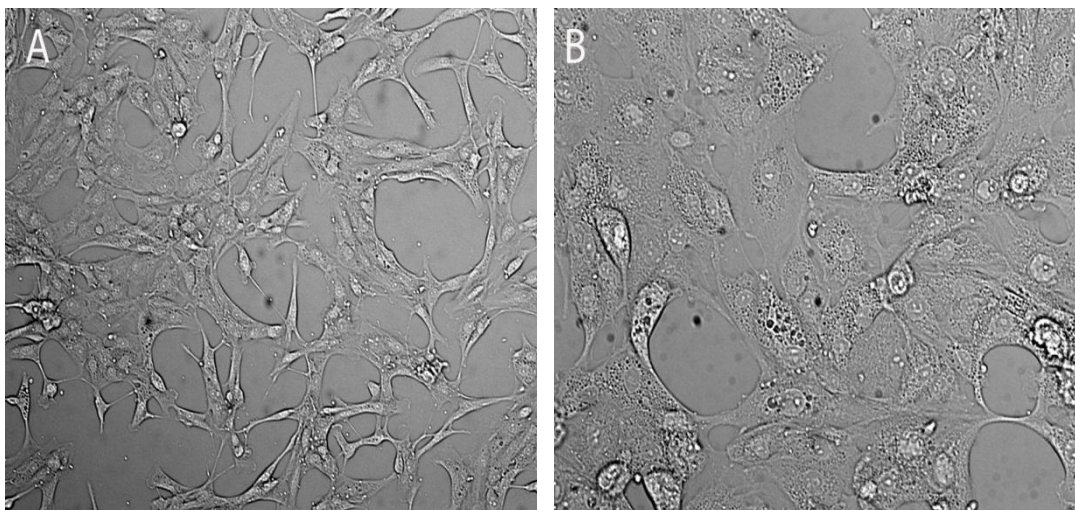


Obrázek 5.16 HRPTE buňky infikované BK virem. (A) Buněčné jádro, kde jsou zeleně označena PML tělíska. (B) Strukturní virový protein VP1 přítomný v jádře infikované buňky v tomto postinfekční čase (48 hpi), označen červeně. (C) Replikující se DNA, označena bíle. (D) Souhrnný snímek všech kanálů. (Značení DNA viz text, PLM tělíska značena primární monoklonální myší protilátkou proti PLM proteinu (zeleně) a sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s AlexaFluor 488, VP1 značen primární polyklonální králičí protilátkou proti VP1 BKV a sekundární protilátkou proti králičím imunoglobulinům konjugovanou s AlexaFluor 546).



Obrázek 5.17 Porovnání infikované a neinfikované buňky, za současného značení PML tělísek a virového VP1 proteinu. (A) Infikovaná buňka, červeně je označen virový protein VP1, zeleně jsou značena PML tělíska. (B) Neinfikovaná buňka, zeleně jsou označena PML tělíska. Je patrné, že BKV infekce ovlivňuje počet a velikost PML tělíse v buněčném jádře. Značení proteinů viz popis obr. 5.16.

Infekce BK virem měla důsledky na celkový buněčný stav. To bylo možné pozorovat v pozdějších stádiích infekce, i když multiplicita infekce byla nízká (MOI=0,1). Silný cytopatický efekt lze pozorovat 72 hpi (viz obr. 5.18).



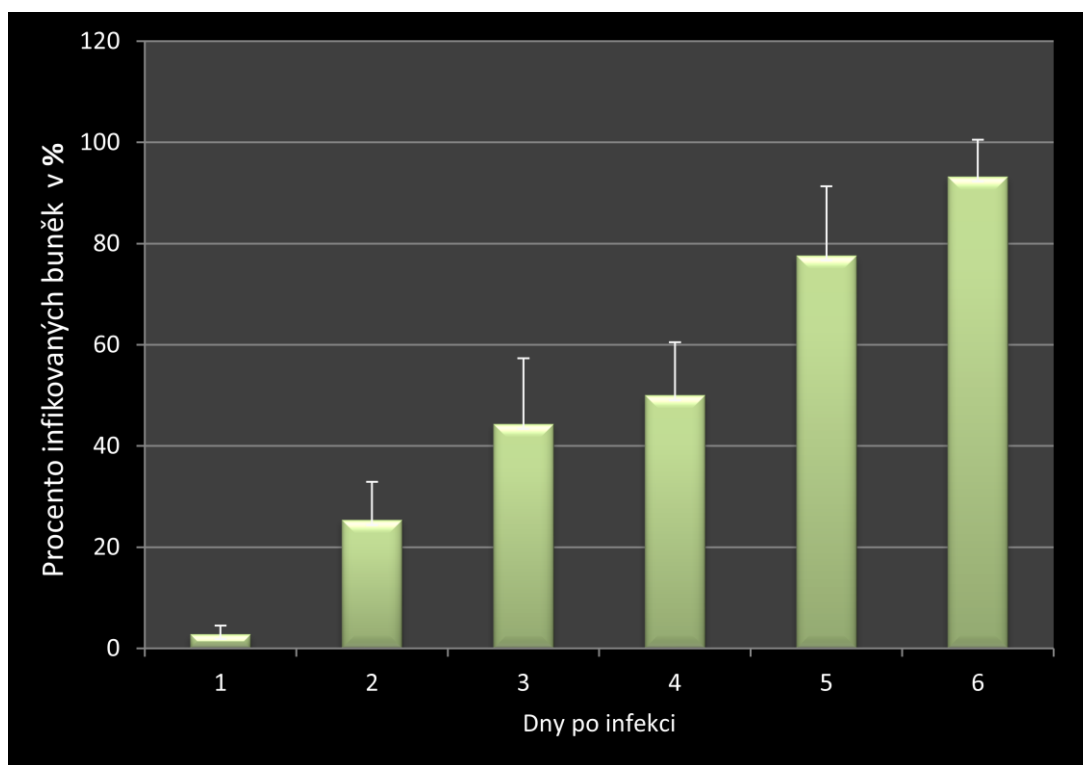
Obrázek 5.18 Porovnání neinfikovaných a infikovaných buněk. (A) Neinfikované HRPTE buňky. (B) Infikované HRPTE buňky, 72 hpi. V obou případech bylo nasazeno stejné množství buněk. Zvětšeno 200x.

5.7 Reinfekce

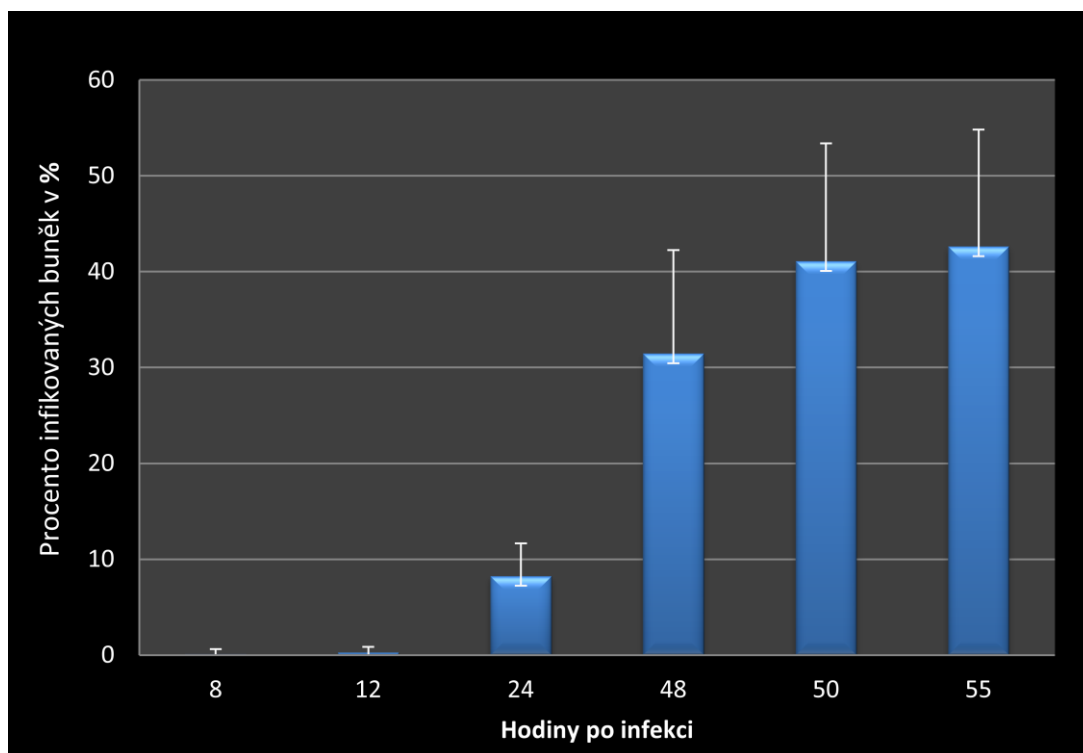
Jednou z otázek, které zanechalo dosavadní studium BKV je doba jeho životního cyklu. Dřívější studie ukazují, že BKV má mnohem delší replikační cyklus než příbuzné viry SV40 a MPyV (Acott et al., 2006). Tyto studie ale byly prováděny na liniích opičích buněk. Abychom určili dobu, za kterou se v kultuře permissivních HRPTE buněk vytvoří nová generace infekčních virionů, sledovali jsme šíření viru v takové kultuře.

Lidské HRPTE buňky narostlé na sklíčkách byly infikovány s nízkou multiplicitou infekce ($MOI=0,1$) a postupně fixovány každých 24 hodin od počátku infekce po dobu 6 dní (tj. 24 hpi = 1dpi, a dále 2, 3, 4, 5 a 6 dpi). Tyto byly dále imunofluorescenčně značeny na přítomnost virových antigenů. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 5.19, kde u buněk fixovaných 3 dpi (viz obr. 5.19 (C)) můžeme pozorovat reinfekci nových buněk v ohniscích, v jejichž centru se nacházela buňka infikovaná v prvním kole infekce, a která dala vzniku infekčnímu virovému potomstvu. Výsledky jsou zároveň shrnuty v grafu 5.1, kde je jasně vidět skokový nárůst počtu buněk produkujících časné virové antigeny 3. a 5. den infekce, což odpovídá infekci těchto buněk o 12 – 20 hodin dříve,

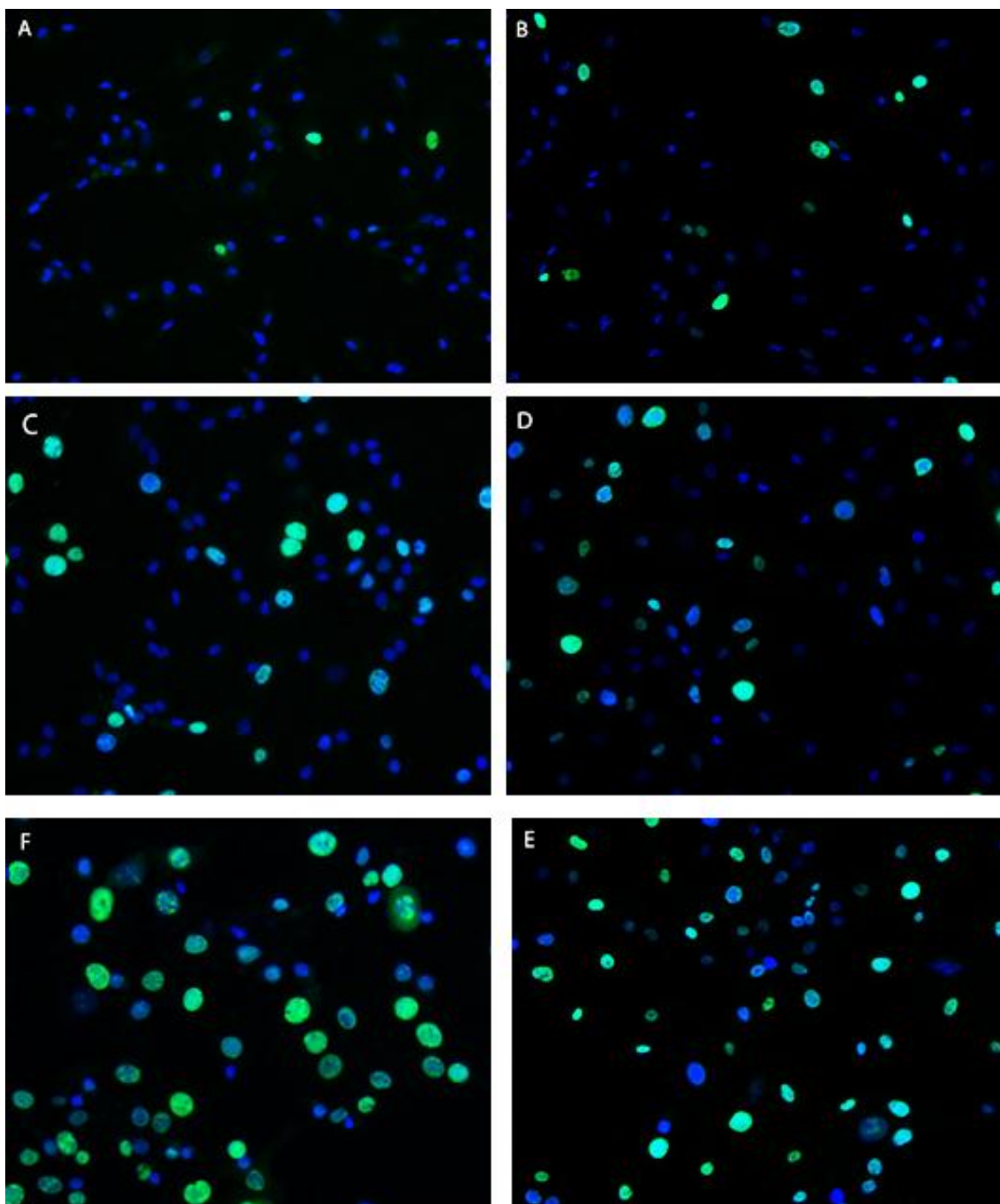
v souladu s výsledky v kap. 5.5. Abychom tento výsledek potvrdili, provedli jsme další infekci ($MOI = 0,1$). Buňky jsme následně fixovali 8, 12, 24, 48, 50 a 55 hpi, imunofluorescenčně značily na virové antigeny a prováděli kvantitativní analýzu výsledků. Celkem bylo spočítáno 40 zorných polí ze 4 různých paralel z každého času po infekci. Počty infikovaných buněk byly zprůměrovány a zaneseny do grafu (viz graf 5.2). Z takto získaných výsledků vyplývá, že replikační cyklus BK viru trvá 40 - 50 hodin. Tento výsledek se přiklání k naší pracovní hypotéze o tom, že životní cyklus BK viru na permissivních buňkách je přibližně stejně dlouhý jako u ostatních polyomavirů a zároveň odporuje dosavadnímu tvrzení o značně delším životním cyklu BKV, které byly ovšem získány pěstováním viru na částečně nepermissivních opičích buňkách (Acott et al., 2006).



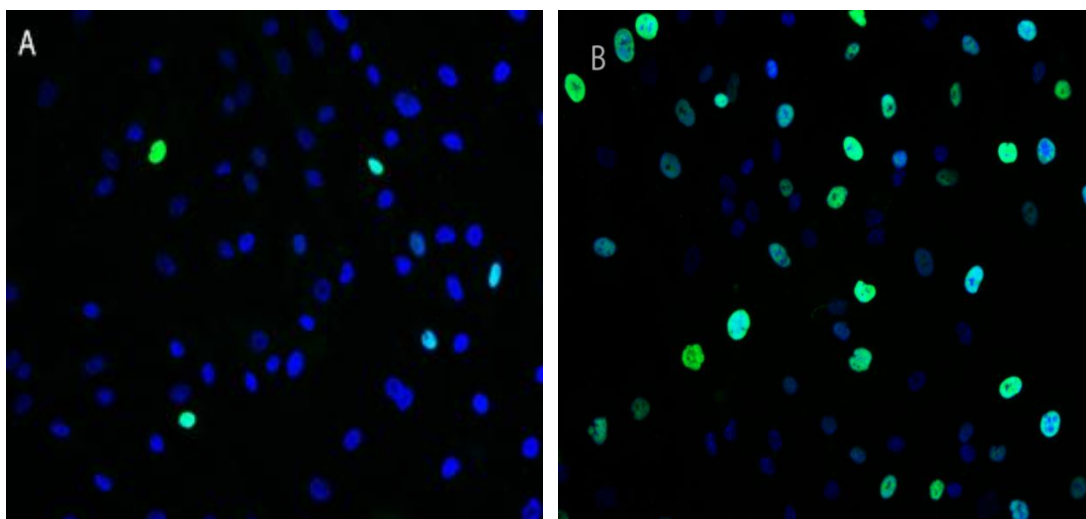
Graf 5.1 Procento infikovaných buněk v různých dnech po infekci BKV.



Graf 5.2 Procento infikovaných buněk v různých časech po infekci BKV.



Obrázek 5.19 Imunofluorescenční snímky infikovaných buněk. Buňky byly fixovány a značeny primární myší monoklonální protilátkou proti LT antigenu příbuzného viru SV40 a následně se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s AlexaFluor488. (A) Buňky po 1 dpi, LT antigen – zeleně, DNA značena vždy modře DAPI. (B) 2 dpi, (C) 3 dpi – jasně zřetelná reinfekce okolních buněk, (D) 4 dpi, (E) 5 dpi, (F) 6 dpi – infekce přítomna téměř u všech buněk. Zvětšeno 200x.



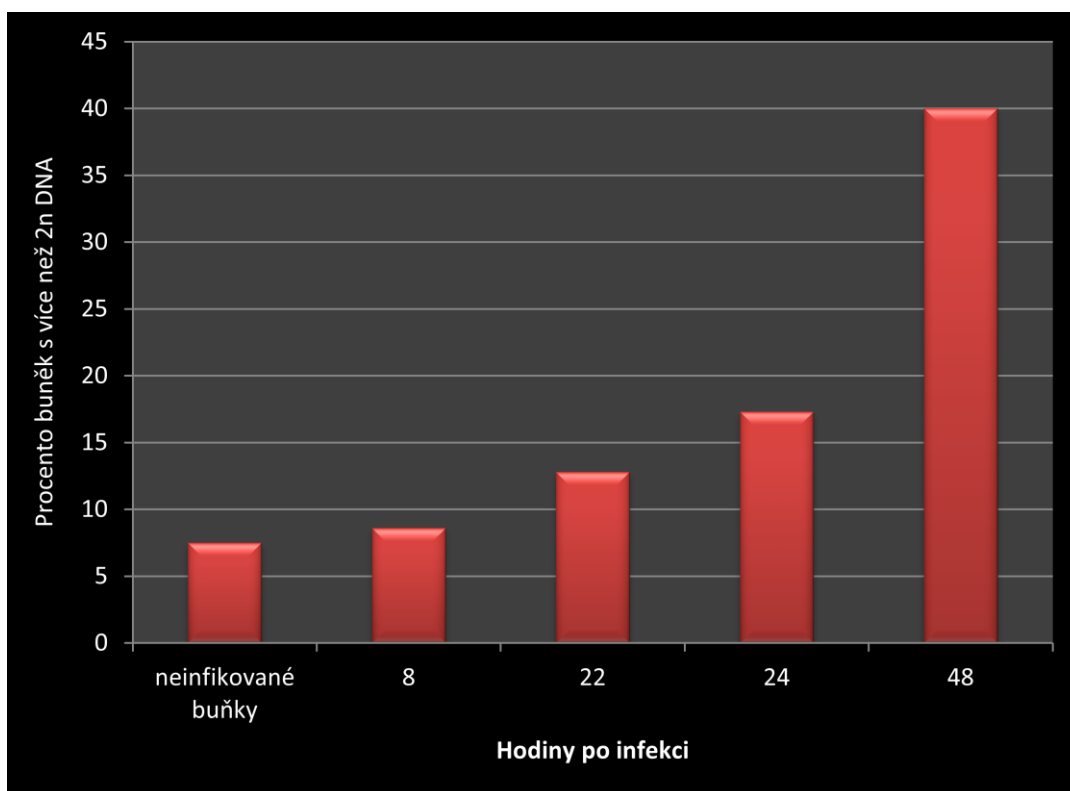
Obrázek 5.20 Imunofluorescenční snímky infikovaných buněk. Buňky byly fixovány a značeny primární myší monoklonální protilátkou proti LT antigenu příbuzného viru SV40 a následně se sekundární protilátkou proti myším imunoglobulinům konjugovanou s AlexaFluor488. (A) Buňky po 24 hodinách infekce, (B) 50 hodin po infekci LT antigen – zeleně, DNA značena v obou případech modře DAPI, v tomto čase je již pozorovatelná reinfekce z buňky se silnou expresí LT na okolní buňky. Zvětšeno 200x.

5.8 Ovlivnění buněčného cyklu BK virovou infekcí

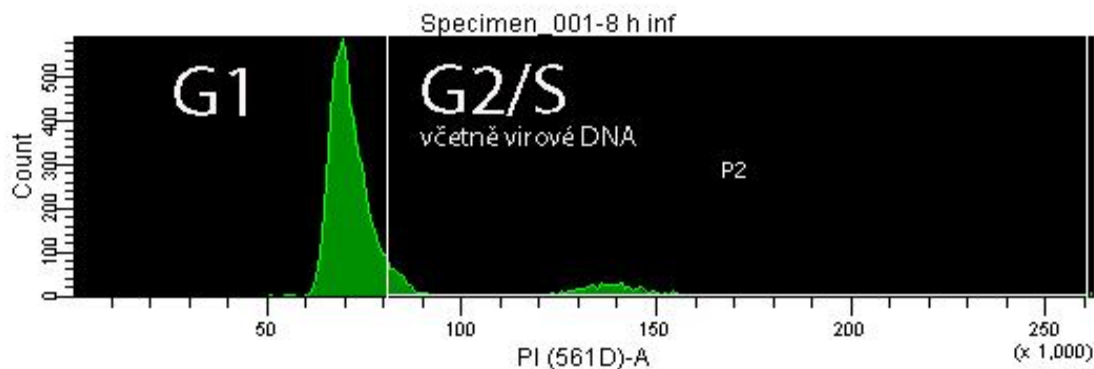
Všechny polyomaviry mají díky časným T antigenům onkogenní potenciál. Ten je mimo jiné dán schopností těchto proteinů deregulovat buněčný cyklus a posunout buňku do S fáze buněčného cyklu. Zároveň jak je známo ze studií provedených na SV40 a MPyV, ale nedochází k mitóze a vznikají tak buňky se silně zmnoženým obsahem DNA. Vzhledem k tomu jsme se rozhodly rozšířit tuto práci o jednoduchou studii která by testovala takové vlivy na HRPTE buňky i u námi studovaného BK viru. K tomuto účelu jsme se rozhodly použít metodu průtokové cytometrie, kdy u synchronizovaných a infikovaných buněk (imunofluorescenční kontrola infekce viz obr. 5.24) bylo zjišťováno množství

DNA a to v různých časech po infekci. Podle získaných výsledků je patrné, že množství virové i buněčné DNA narůstá od 22 do 48 hodin.

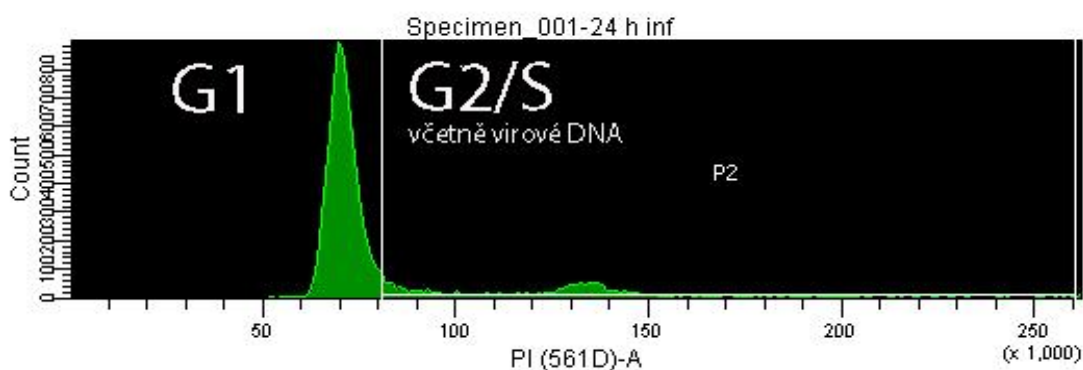
K významnějšímu nárůstu množství DNA dochází mezi 24 a 48 hodinami, kde narůstá počet buněk s více než $2n$ DNA, u nichž došlo k zmnožení DNA ale ne k rozdělení buňky (viz obr. 5.22; 5.23). Lze to přičíst replikaci virové DNA, která je v této době pozorovatelná i z provedených experimentů metodou FISH a především replikací buněčného genomu pod vlivem časných antigenů viru. Tento efekt byl dříve pozorován u MPyV, ale s mnohem větší intenzitou, což je pravděpodobně způsobeno velkými rozdíly mezi primárními buňkami použitými ke studiu BK viru a stálou buněčnou linií, kde byl studován myší polyomavirus.



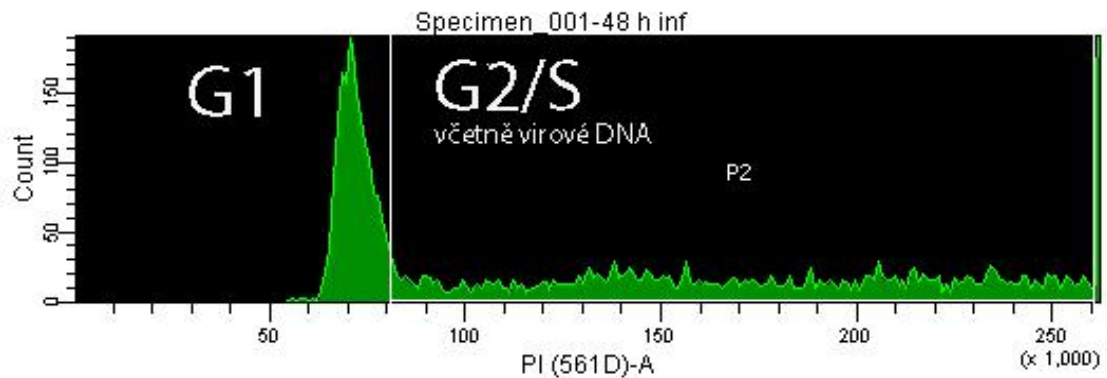
Graf 5.3 Procento buněk s více než $2n$ DNA v různých časech po infekci.



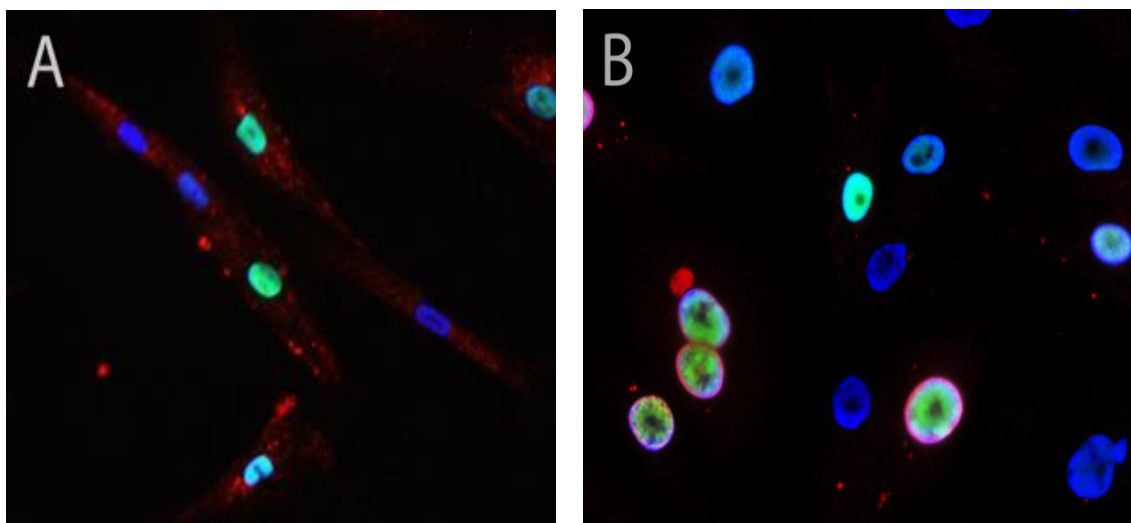
Obrázek 5.21 HRPTE buňky infikované BKV. Virová i buněčná DNA byla značena pomocí propidium jodidu. V době 8 hpi se většina buněk (91 %) nachází v G1 fázi buněčného cyklu.



Obrázek 5.22 HRPTE buňky infikované BKV. Virová i buněčná DNA byla značena pomocí propidium jodidu. V době 24 hpi se 83 % buněk nachází v G1 fázi buněčného cyklu.



Obrázek 5.23 HRPTE buňky infikované BKV. Virová i buněčná DNA byla značená pomocí propidium jodidu. V době 48 hpi je velké množství buněk (40 %) s obsahem DNA vyšším než 2n.

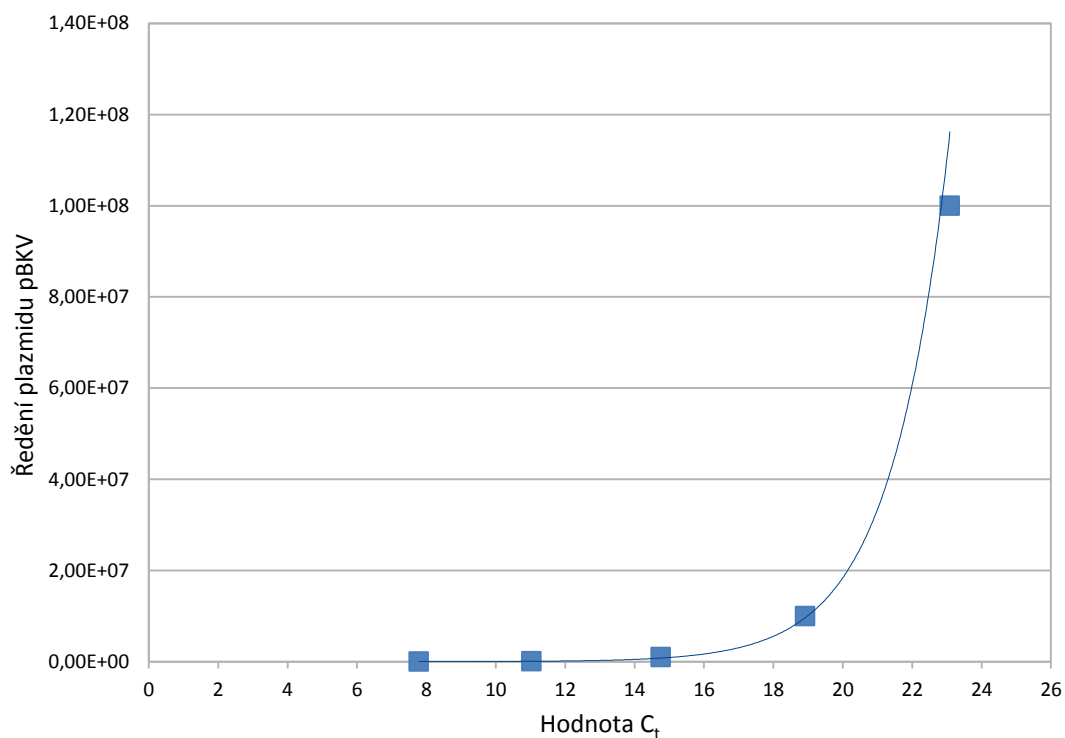


Obrázek 5.24 Imunofluorescence infikovaných buněk HRPTE. (A) Pozdní virový protein VP1 (červeně) je v 24 hodinách po infekci přítomný pouze v cytoplasmě. Zeleně značený LT antigen je přítomný v buněčném jádře, zvětšeno 200x. (B) Zde VP1 protein (červeně) je v 48 hodinách po infekci přítomný v buněčném jádře, LT antigen (zeleně) zůstává přítomný v buněčném jádře, zvětšeno 400x. DNA je značena v obou případech modře DAPI.

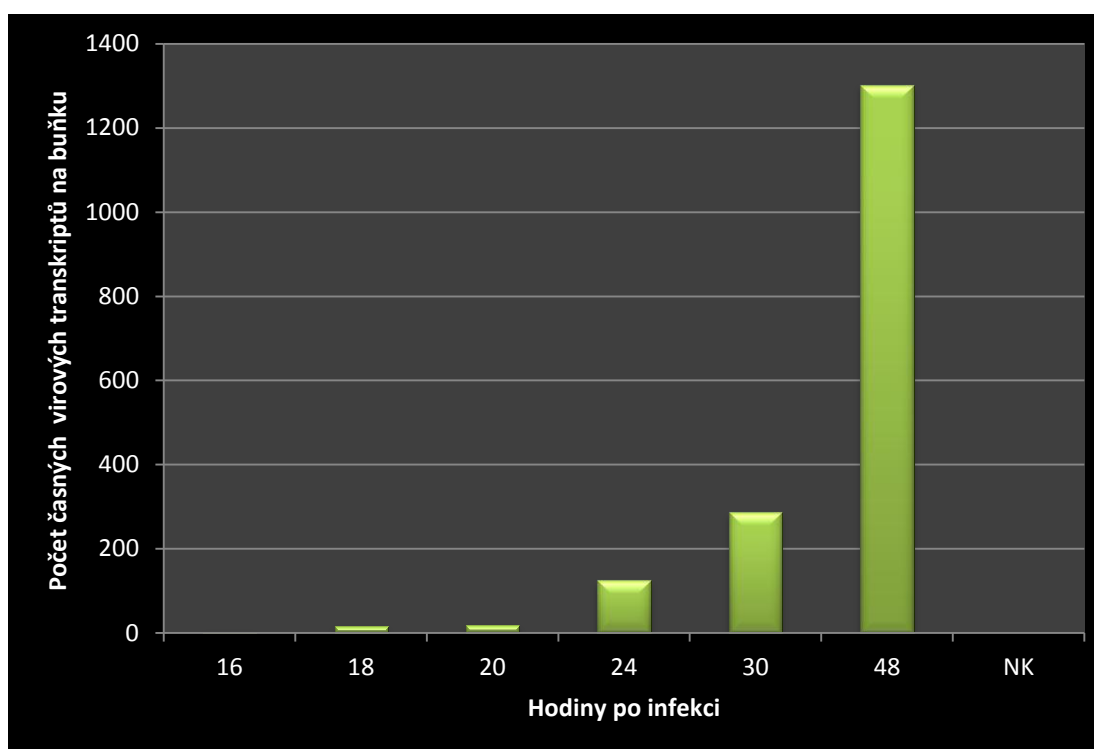
5.9 Kvantitativní *real time* PCR

Pro určení postinfekčních časů, kdy dochází ke vzniku časných virových transkriptů byla použita metoda kvantitativní *real time* PCR. Z infikovaných buněk v různých časech po infekci byla izolována celková RNA a z ní byla vyrobena cDNA (viz kap. 4.2.6; 5.4). Z takto připravených templátů byla provedena PCR reakce.

Jako standard pro určení počtu kopií virových genomů na buňku byla použita reakce, kdy jako templát sloužil plazmid obsahující BK virový genom. Tento plazmid byl naředěn a u jednotlivých ředění byla provedena PCR reakce s primery specifickými pro virový LT antigen. Z vyhotovené kalibrační křivky, bylo vypočítáno množství časných virových transkriptů přítomných v jedné infikované buňce v různých časech po infekci (viz graf 5.5).



Graf 5.4 Kalibrace počtu kopií naředěného plazmidu pBKV na odpovídající hodnotu C_t – tedy na počet cyklů nutných pro první detekci daného ředění plazmidu. Pro tuto reakci byly použity primery specifické pro úsek LT antigenu BK viru.



Graf 5.5 Množství časných virových transkriptů v různých časech po infekci přítomných v jedné infikované buňce. Pro tuto PCR reakci byly použity primery specifické pro LT antigen BKV (viz kap. 4.1.6).

6. DISKUSE

6.1 Ověření negativity HRPTE buněk na BK virus

Buňky HRPTE používané v této práci byly nově zakoupeny výhradně za účelem studia infekčního cyklu BK viru. Tyto buňky dosud nebyly v naší laboratoři používány. Navíc se jedná o primární buňky odvozené z ledvin konkrétních pacientů, které nebyly testovány na přítomnost BKV. Vzhledem k značné proinfikovanosti lidské populace (80-90%) tímto virem (Knowles et al., 2003; Jordan et al., 2009), bylo nejprve potřeba diagnostikovat stav těchto buněk. Z výsledku vyplynulo, že HRPTE buňky, dále používané ve všech experimentech, neobsahovaly BK virovou DNA pro VP1 protein a tedy ani infekční virový genom (viz obr. 5.1).

6.2 Určení virové identity

Další možnou komplikací během studia BK viru je jeho případná kontaminace příbuzným primátím virem SV40, který je v naší laboratoři také používán a již dříve se takovéto komplikace vyskytly i u vzorků poskytnutých cizí renomovanou laboratoří (shrnutí v DP Čáslavský, 2009). Tyto viry jsou si velice příbuzné. Aminokyselinová sekvence jejich strukturního proteinu VP1 je z 88 % identická, velké procento identické sekvence bylo prokázáno u LT antigenu těchto virů – 73% (Johnson et al., 2010). Pro určení virové identity byla izolována virová DNA použita jako templát pro PCR reakci s primery specifickými pro BK a SV40 virus. Výsledky prokázaly přítomnost BK virových genomů v infikovaných buňkách a zároveň nepřítomnost kontaminující SV40 DNA (viz obr. 5.2).

6.3 Izolace BK viru

Následujícím nezbytným krokem byla virová izolace. Virus byl namnožen v HRPTE buňkách a jeho izolace probíhala standardním postupem, který se

s úspěchem používá v naší laboratoři i pro ostatní polyomaviry. Průběh infekce byl kontrolován jak imunofluorescenčním barvením virových proteinů v buněčných preparátech, tak i imunodetekcí virových produktů v lyzátech infikovaných buněk (viz obr. 5.3, 5.4). Výsledky izolace a následného imunofluorescenčního určení virového titru byly zcela dostačující pro další používání takto připraveného viru. Infekční titr se pohyboval v řádech $1 \cdot 10^8$ virových částic v 1 ml. Elektronmikroskopické smínky vyizolovaného viru ukázaly celistvost virionů, čistotu preparace a velké procento plných virových kapsid ve frakci, která svojí vznášivou hustotou odpovídala hustotě plných virionů (viz obr. 5.6, 5.7 a tab. 5.2). Hodnota hemaglutinačního titru viru byla $1 \cdot 10^{11}$, tato hodnota je o tři řády vyšší než titr infekčních částic. Tento fakt je ve schodě s předpokladem, že tento titr odpovídá počtu všech virových částic, jak plných (infekčních), tak prázdných (neinfekčních).

6.4 Izolace RNA z infikovaných buněk

Rozhodující pro úspěšnou izolaci RNA je čistota preparace a správná manipulace s již vyizolovanou RNA. Celkovou buněčnou i virovou RNA se podařilo vyizolovat s čistotou a koncentrací, které byly dostačující pro provedení dalších námi plánovaných experimentů (viz obr. 5.8, tab. 5.3). U izolace 16 hpi pravděpodobně došlo k částečné degradaci RNA během manipulace se vzorkem, i přes nízkou koncentraci se i tato preparace dala použít pro další pokusy.

Z již vyizolovaných vzorků RNA byly připraveny odpovídající cDNA, které sloužily jako templáty pro PCR reakce, v nichž jsme dokazovaly přítomnost a množství virových transkriptů.

Nejprve byla pro ověření funkčnosti primerů použita klasická PCR reakce, kde vznikaly námi požadované produkty se specifitou dostačující pro provedení kvantitativní *real time* PCR (viz obr. 5.9 a 5.10).

6.5 Určení exprese virových proteinů

Pro zjištění časů, kdy dochází k expresi časných a pozdních virových produktů byly využity metody imunologické detekce proteinů na membráně po SDS - PAGE elektroforéze a imunofluorescenční značení virových produktů v preparátech infikovaných buněk.

První detekce LT antigenu v infikovaných buňkách byla možná v 12 hpi, protein byl vizualizován imunofluorescenčním barvením buněk a signál odpovídající LT je viditelný na obr. 5.11 (A). Výsledky jsou ve shodě s prací Low et al., 2004, kde autoři detekovali LT antigen, poprvé mezi 12 a 24 hpi. Protein je v této práci detekován po proteinové elektroforéze a viditelná hladina LT je zřetelná spíše v 24 hpi. Moje pokusy o detekci LT antigenu BKV protilátkou namířenou proti LT příbuzného SV40, po přenesení proteinů na membránu po SDS – PAGE, dopadly neúspěchem. Tento výsledek je pravděpodobně způsoben denaturací LT antigenu BKV, což může být způsobeno ztrátou vazebné specifity protilátky. Komerční protilátka proti LT BKV v tuto chvíli není k dispozici a ani jedna z komerčních protilátek – jakkoli rozeznávají antigen v nativním stavu – není schopná detekovat denaturovaný BK virový protein. Pro další pokusy s BKV by bylo potřeba připravit in vitro protein a imunizovat zvířata za účelem získání polyklonální, či – ideálně – monoklonální protilátky. To však přesahuje rozsah mé práce.

V případě pozdních virových produktů byly použity obě metody detekce – jak imunofluorescencí, tak i imunodetekcí na membráně. V obou případech je přítomnost VP1 prokazatelná v 30 hpi (viz obr. 5.11 (B), 5.12). Množství tohoto proteinu stoupalo kontinuálně s probíhající infekcí až do doby 72 hpi, kdy byl experiment ukončen (viz obr. 5.12). Výsledek těchto pokusů je ve srovnání s prací Low et al., 2004 poněkud rozdílný. V předem jmenované publikaci autoři detekovali VP1 protein až v době 36 hpi, v jejich analýze však chyběl čas 30

hpi, nejbližším časem, který zkoumali byl 24 hpi. V tomto čase, stejně jako my, detekovali jen zbytkové VP1 ze vstupivšího viru.

Dále jsme sledovali i výskyt minoritních strukturních proteinů VP2 a VP3. Detekovatelné hladiny těchto virových produktů se podařilo zaznamenat nejdříve v 48 hpi (viz obr. 5.14). Toto zpoždění oproti VP1 je pravděpodobně způsobeno menším množstvím těchto proteinů ve vstupujících virionech i menším množstvím VP2 a VP3 potřebným pro sestavení nových, funkčních virionů a tedy jejich celkovou nižší hladinou v buňce. Při imunodetekci VP2 a VP3 jsme vždy detekovali několik různých forem proteinu. To pravděpodobně znamená, že se tyto proteiny v infikované buňce vyskytují v různých modifikovaných formách, jak to bylo zdokumentováno ve studii Fang et al., 2010, kde byly nalezeny následující modifikace VP2 proteinu: karboxymethylace, acetylace, formylace, oxidace, deoxidace a fosforylace. Podobné byly i modifikace u VP3 proteinu, který je ze 2/3 identický s VP2 proteinem, ale narozdíl od něj je modifikován navíc acetylací. V naší laboratoři je dále plánovaná přesná identifikace posttranslačních modifikací minoritní proteinů BKV pomocí hmotnostní spektrometrie.

6.6 Určení začátku virové replikace

Další naše snaha o detailní studium BKV lytického cyklu nás vedla k bližšímu prozkoumání doby, kdy dochází k virové replikaci. Námi zvolená metoda fluorescenční *in situ* hybridizace, nám umožnila detekci virových replikonů v 24 hpi. Vzhledem k tomu, že studie Low et al., 2004 uvádí první zvýšení množství virové DNA v 36 hpi, jsou naše výsledky detekce virové DNA v poměrně dřívějších časech. To může být též způsobeno citlivější metodou, kterou jsme použili.

Virová replikace byla v této práci zkoumána i z hlediska změn, které navozuje v jádře infikované buňky. Již dříve ve studiích Jiang et al., 2011; Jul-Larsen et al., 2004, byly popsány změny navozované virovou infekcí v proteinovém komplexu PLM. Takovéto změny se podařilo pozorovat i v našich

preparátech. Buňky infikované BKV měly menší počet PML tělísek oproti buňkám neinfikovaným (viz obr. 5.17). Proteinové komplexy PML byly větší oproti těm v neinfikovaných buňkách (viz obr. 5.17), tento jev je pravděpodobně způsoben změnou proteinového složení PLM tělísek. Detailnější výzkum změn navozených v PML tělískách způsobených infekcí BKV bude dalším cílem výzkumu v naší laboratoři. V těchto experimentech byla současně značena replikující se DNA, která se vyskytovala v těsné blízkosti PLM tělísek (viz obr. 5.16), což je pravděpodobně způsobeno nutností úprav na virové DNA, které probíhají za účasti PLM tělísek. Zda se opravdu jedná o virovou replikující se DNA, jak předpokládáme, bude nutné dále prozkoumat hybridizací s flourescencní sondou specifickou pro BKV DNA.

6.7 Reinfekce

Abychom mohli určit rychlost šíření BKV v primární kultuře permissivních HRPTE buněk, provedli jsem sérii reinfekčních experimentů.

Ty spočívaly v sledování počtu infikovaných buněk v pravidelných intervalech. Infikované buňky jsme přitom identifikovali na základě imunofluorescenční detekce časných virových antigenů v jejich jádrech. V souladu s očekáváním se ukázalo, že v pravidelných intervalech dochází ke skokovému nárůstu počtu infikovaných buněk. K prvnímu takovému nárůstu v počtu infikovaných buněk dochází mezi prvním a druhým dnem po infekci, kdy se v buněčné kultuře ustavuje primární infekce. V době mezi druhým a třetím dnem po infekci dochází k detekci buněk obsahujících LT antigeny v okolí dříve napadené buňky, kde je infekce již dobře detekovatelná vysokou úrovní exprese LT antigenu. Jev lze pozorovat na obr. 5.16 (B), kde jsou vidět buňky s vyšší intenzitou exprese LT – jasněji zelené a buňky okolní, čerstvě nainfikované s nižší intenzitou exprese LT antigenu. Reinfekce okolních buněk se projevuje i na výrazném zvýšení počtu LT pozitivních buněk. Další kolo reinfekce nastává mezi čtvrtým a pátým dnem, což se opět projevuje skokovým nárůstem LT pozitivních buněk, data shrnuta v grafech 5.1, 5.2. Ke konci

experimentu v 6 dpi je infikovanost buněčné kultury téměř 100 %, zároveň je pozorovatelný značný cytopatický efekt viru.

6.8 Ovlivnění buněčného cyklu BK virovou infekcí

Polyomaviry jsou, podobně jako jiné malé DNA viry, viry se značným onkogenním potenciálem. Ten je dán aktivitou jejich časných antigenů, které buňky vyvazují z kontroly buněčného cyklu, negativně regulují apoptózu a navozují syntézu DNA. Přes tento značný potenciál dosud, s výjimkou nově objeveného viru buněk Merklova karcinomu (Merkel cell carcinoma virus), nebyla prokázána souvislost mezi infekcí polyomaviry a nádorovým bujením u lidských pacientů. V pokusech, kde byl zkoumán obsah DNA u buněk infikovaných BKV, bylo potvrzeno, že infekce tímto polyomavirem působí změny v buněčném cyklu, zmnožení buněčné (a virové DNA) a pravděpodobně dochází k zabránění vstupu buňky do mitózy, což způsobuje výskyt tetraploidních i víceploidních buněk ve vzorku 48 hpi (viz obr. 5.22). V této době po infekci již dochází k vysokému stupni replikace BKV (zjištěno, že replikace BKV začíná o 24 hodin dříve) a exprese vysokých hladin časných virových proteinů (viz obr. 5.23). Toto zjištění je potvrzením dřívejších pozorování, kde se například ukázalo, že buňky infikované virem SV40 se po dokončení první S fáze buněčného cyklu přesouvaly do G2 fáze, dále docházelo k blokaci vstupu do mitózy a buňky vstupovaly do další syntetické fáze. Obsah DNA v takto infikovaných buňkách byl převážně buněčného původu, kde přibližně 4 kopie buněčného genomu pocházely z první S fáze a 4-6 kopií buněčné DNA pocházelo z druhé S fáze. Podíl virové DNA byl v tomto případě 0,5 - 2 kopie virové DNA na buňku (Lehman et al., 2000).

6.9 Kvantitativní *real time* PCR

Tato metoda byla použita pro přesnější určení doby v životním cyklu BKV, kdy dochází ke vzniku virových produktů na úrovni RNA. Nejvíce se podařilo

objasnit vznik časných virových transkriptů, reprezentovaných hlavním virovým proteinem časně fáze LT antigenem (viz graf 5.5). Je patrné, že transkripce časných virových produktů je možno detekovat již v 16 hpi. Detekce časných transkriptů by pravděpodobně byla možná již v dřívějších časech po infekci, z časových důvodů jsou tyto experimenty plánovány pro další výzkum v naší laboratoři. K výraznému nárůstu množství časných transkriptů dochází v 24 hpi, stonásobné množství oproti hodnotě v 16 hpi. Další výrazný skok v počtu časných transkriptů zaznamenáváme v 48 hpi, kdy je jejich množství tisícinásobné v porovnání s buňkami infikovanými 16 hodin. To víceméně odpovídá předchozímu zjištění o délce životního cyklu BKV. První kolo infekce trvá od primární infekce zhruba do 48 hpi. Množství časných virových transkriptů přitom kontinuálně narůstá od 16 hpi do 24 hpi, kdy začíná docházet k replikaci a následně 30 hpi k přepnutí na pozdní virovou expresi.

Byly provedeny i další pokusy, při kterých jsme se snažili o vytvoření časové posloupnosti vzniku pozdních virových produktů. Předběžné výsledky ukazují, že první detekce transkriptů pozdních virových produktů je možná od 20 hpi. Tyto výsledky jsou však předběžné a budou vyžadovat další výzkum.

7. SOUHRN

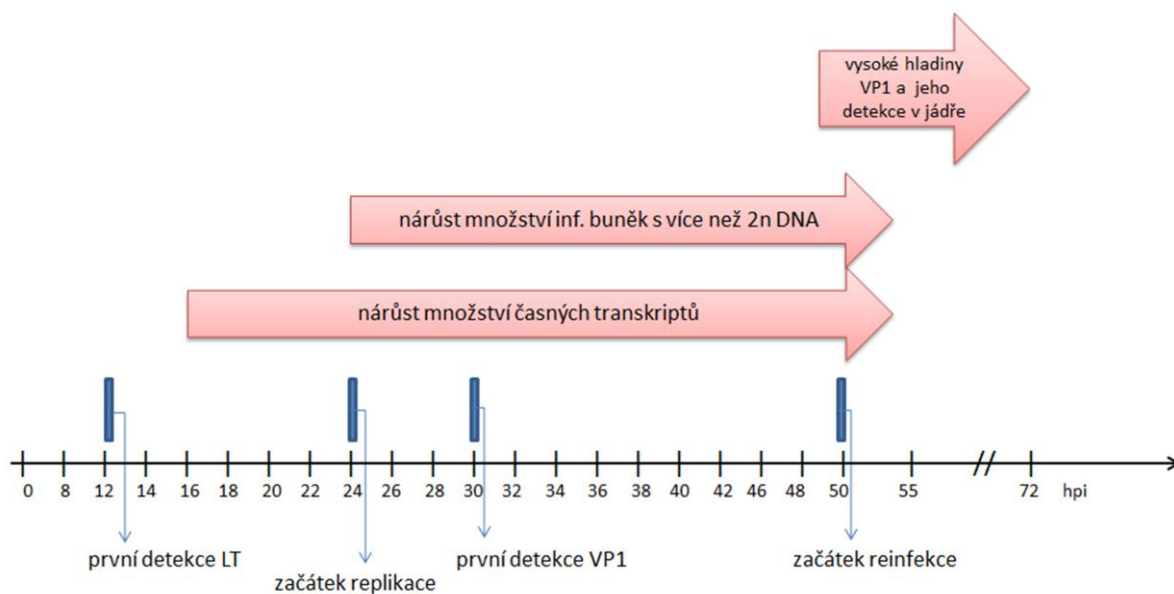
7.1 Pomnožení viru v buňkách HRPTEC, izolace BKV, určení jeho množství a infekivity.

BK virus se podařilo úspěšně pomnožit v přirozených HRPTE buňkách, i přes to, že šlo o nový systém pro naši laboratoř a zároveň se jednalo o primární kulturu buněk, která vyžadovala velké pracovní nasazení a kladla vysoké finanční nároky na laboratoř. Virus byl s dobrým výtěžkem izolován, kdy jeho infektivita a množství byly dostačující pro provedení všech dalších pokusů. Izolace BKV byla prováděná několikrát pro zajištění dostačujícího množství viru po celou dobu práce, tímto vznikl ustálený systém izolace tohoto viru.

7.2 Určení začátku virové replikace a postinfekčních časů, kdy dochází k expresi časných a pozdních virových proteinů. Vliv infekce na procesy v hostitelské buňce.

Virovou replikaci se prvně podařilo detekovat v 24 hpi. Tento výsledek je ve shodě i s řadou dalších experimentů, které sloužily pro detekci času vzniku ostatních virových produktů. První výskyt časného LT antigenu byl pozorován 12 hpi. Pozdní VP1 protein byl prvně detekován v 30 hpi, proteiny VP2 a VP3 byly prvně detekovány 48 hpi.

Bylo zjištěno, že BK virová replikace vede ke vzniku cytopatického efektu v buněčné kultuře, kdy zároveň bylo pozorováno, že značná část infikovaných buněk je v pozdní fázi infekce polyploidních.



Graf 7.1 Souhrn některých z nejvýznamnějších výsledků dosažených během studia životního cyklu BKV. Na ose jsou znázorněny hodiny po infekci.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol.* 2009 Aug;19(4):252-60. Epub 2009 Feb 21.

Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ. A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J Gen Virol.* 2009 May;90(Pt 5):1238-45. Epub 2009 Mar 4.

Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Global effects of BKV infection on gene expression in human primary kidney epithelial cells. *Virology.* 2010 Feb 5;397(1):73-9. Epub 2009 Nov 28.

Abend JR, Low JA, Imperiale MJ. Inhibitory effect of gamma interferon on BK virus gene expression and replication. *J Virol.* 2007 Jan;81(1):272-9. Epub 2006 Oct 11.

Acott PD, O'Regan PA, Lee SH, Crocker JF. Utilization of vero cells for primary and chronic BK virus infection. *Transplant Proc.* 2006 Dec;38(10):3502-5.

Ahuja D, Sáenz-Robles MT, Pipas JM. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. *Oncogene.* 2005 Nov 21;24(52):7729-45.

Ali SH, DeCaprio JA. Cellular transformation by SV40 large T antigen: interaction with host proteins. *Semin Cancer Biol.* 2001 Feb;11(1):15-23.

Andrei G, Snoeck R, Vandeputte M, De Clercq E. Activities of various compounds against murine and primate polyomaviruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997 Mar;41(3):587-93.

Ashok A, Atwood WJ. Contrasting roles of endosomal pH and the cytoskeleton in infection of human glial cells by JC virus and simian virus 40. *J Virol.* 2003 Jan;77(2):1347-56.

Barbanti-Brodano G, Martini F, Corallini A, Lazzarin L, Trabanelli C, Vignocchi B, Calza N, Iaccheri L, Morelli C, Tognon M. Reactivation of infectious simian virus 40 from normal human tissues. *J Neurovirol*. 2004 Jun;10(3):199-205.

Bollag B, Chuke WF, Frisque RJ. Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. *J Virol*. 1989 Feb;63(2):863-72.

Campbell KS, Mullane KP, Aksoy IA, Stubdal H, Zalvide J, Pipas JM, Silver PA, Roberts TM, Schaffhausen BS, DeCaprio JA. DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev*. 1997 May 1;11(9):1098-110.

Cole, CN.; Conzen, SD. Polyomaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe, DM.; Howley, PM., editors. *Fields Virology*. Vol. 2. Vol. 4. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2141-74.

Daha MR, van Kooten C. Is the proximal tubular cell a proinflammatory cell? *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 Suppl 6:41-3.

Dörries K. Molecular biology and pathogenesis of human polyomavirus infections. *Dev Biol Stand*. 1998;94:71-9.

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with alpha(2,3)-linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol*. 2005 Nov;79(22):14442-5.

Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. Update on BK virus entry and intracellular trafficking. *Transpl Infect Dis*. 2006 Jun;8(2):62-7.

Dugan AS, Gasparovis ML, Atwood WJ: Direct correlation between sialic acid binding and infection of cells by two human polyomaviruses (JC virus and BK virus). *Journal of Virology* 2008, 82 (5): 2560-2564

Eash S, Atwood WJ. Involvement of cytoskeletal components in BK virus infectious entry. *J Virol*. 2005 Sep;79(18):11734-41.

Eash S, Querbes W, Atwood WJ. Infection of vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol*. 2004 Nov;78(21):11583-90

Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N, Leuenberger D, Gosert R, Hirsch HH. Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Sep;22 Suppl 8:viii72-viii82.

Engel S, Heger T, Mancini R, Herzog F, Kartenbeck J, Hayer A, Helenius A. Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J Virol*. 2011 May;85(9):4198-211. Epub 2011 Feb 23.

Erickson KD, Garcea RL, Tsai B. Ganglioside GT1b is a putative host cell receptor for the Merkel cell polyomavirus. *J Virol*. 2009 Oct;83(19):10275-9. Epub 2009 Jul 15.

Fang CY, Chen HY, Wang M, Chen PL, Chang CF, Chen LS, Shen CH, Ou WC, Tsai MD, Hsu PH, Chang D. Global analysis of modifications of the human BK virus structural proteins by LC-MS/MS. *Virology*. 2010 Jun 20;402(1):164-76. Epub 2010 Apr 9.

Gasparovic ML, Gee GV, Atwood WJ. JC virus minor capsid proteins Vp2 and Vp3 are essential for virus propagation. *J Virol*. 2006 Nov;80(21):10858-61.

Gasparovic ML, Maginnis MS, O'Hara BA, Dugan AS, Atwood WJ. Modulation of PML protein expression regulates JCV infection. *Virology*. 2009 Aug 1;390(2):279-88. Epub 2009 Jun 11.

Gilbert J, Dahl J, Riney C, You J, Cui C, Holmes R, Lencer W, Benjamin T. Ganglioside GD1a restores infectibility to mouse cells lacking functional receptors for polyomavirus. *J Virol*. 2005 Jan;79(1):615-8.

Gross L. Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 X g), Ak-leukemic extracts. *Cancer*. 1953 Sep;6(5):948-58.

Harris KF, Chang E, Christensen JB, Imperiale MJ. BK virus as a potential co-factor in human cancer. *Dev Biol Stand*. 1998;94:81-91.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis*. 2003 Oct;3(10):611-23.

Chen L, Fluck M. Kinetic analysis of the steps of the polyomavirus lytic cycle. *J Virol*. 2001 Sep;75(18):8368-79.

Imperiale MJ. Oncogenic transformation by the human polyomaviruses. *Oncogene* 2001;20(54):7917–23.

Imperiale MJ. The human polyomaviruses, BKV and JCV: molecular pathogenesis of acute disease and potential role in cancer. *Virology* 2000;267(1):1–7.

Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol*. 2009 Feb;83(3):1350-8. Epub 2008 Nov 26

Jiang M, Entezami P, Gamez M, Stamminger T, Imperiale MJ. Functional reorganization of promyelocytic leukemia nuclear bodies during BK virus infection. *MBio*. 2011 Feb 8;2(1):e00281-10. doi: 10.1128/mBio.00281-11. Print 2011

Johnson EM. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. *Trends Microbiol*. 2010 May;18(5):215-23. Epub 2010 Feb 20.

Jordan JA, Manley K, Dugan AS, O'Hara BA, Atwood WJ. Transcriptional regulation of BK virus by nuclear factor of activated T cells. *J Virol*. 2010 Feb;84(4):1722-30. Epub 2009 Dec 2.

Jul-Larsen A, Visted T, Karlsen BO, Rinaldo CH, Bjerkvig R, Lønning PE, Bøe SO. PML-nuclear bodies accumulate DNA in response to polyomavirus BK and simian virus 40 replication. *Exp Cell Res*. 2004 Aug 1;298(1):58-73.

Kahan AV, Coleman DV, Koss LG. Activation of human polyomavirus infection-detection by cytologic technics. *Am J Clin Pathol*. 1980 Sep;74(3):326-32

Kawano MA, Inoue T, Tsukamoto H, Takaya T, Enomoto T, Takahashi RU, Yokoyama N, Yamamoto N, Nakanishi A, Imai T, Wada T, Kataoka K, Handa H. The VP2/VP3 minor capsid protein of simian virus 40 promotes the in vitro assembly of the major capsid protein VP1 into particles. *J Biol Chem*. 2006 Apr 14;281(15):10164-73. Epub 2006 Feb 14.

Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, Miller E. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol*. 2003 Sep;71(1):115-23.

Lehman JM, Laffin J, Friedrich TD. Simian virus 40 induces multiple S phases with the majority of viral DNA replication in the G2 and second S phase in CV-1 cells. *Exp Cell Res*. 2000 Jul 10;258(1):215-22.

Liang B, Tikhanovich I, Nasheuer HP, Folk WR. Stimulation of BK virus DNA replication by NFI family transcription factors. *J Virol*. 2012 Mar;86(6):3264-75. Epub 2011 Dec 28.

Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-A resolution. *Nature*. 1991 Nov 28;354(6351):278-84.

Low J, Humes HD, Szczypka M, Imperiale M. BKV and SV40 infection of human kidney tubular epithelial cells in vitro. *Virology*. 2004 Jun 1;323(2):182-8.

Major EO, Amemiya K, Tornatore CS, Houff SA, Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev.* 1992 Jan;5(1):49-73.

Mannová P, Liebl D, Krauzewicz N, Fejtová A, Stokrová J, Palková Z, Griffin BE, Forstová J. Analysis of mouse polyomavirus mutants with lesions in the minor capsid proteins. *J Gen Virol.* 2002 Sep;83(Pt 9):2309-19.

Mäntyjärvi RA, Arstila PP, Meurman OH. Hemagglutination by BK virus, a tentative new member of the papovavirus group. *Infect Immun.* 1972 Nov;6(5):824-8.

Monini P, Rotola A, Di Luca D, De Lellis L, Chiari E, Corallini A, Cassai E. DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology* 1995;214(1):273–9.

Moriyama T, Sorokin A. Intracellular trafficking pathway of BK Virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology.* 2008 Feb 20;371(2):336-49. Epub 2007 Oct 31.

Nakanishi A, Itoh N, Li PP, Handa H, Liddington RC, Kasamatsu H. Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear entry of the viral genome. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):3778-85. Epub 2007 Jan 31.

Neu U, Stehle T, Atwood WJ. The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. *Virology.* 2009 Feb 20;384(2):389-99. Epub 2009 Jan 21.

Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA, Oppenheim A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol.* 2002 May;76(10):5156-66.

Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol.* 2001 May;3(5):473-83.

Pipas JM, Levine AJ. Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 2001 Feb;11(1):23-30.

Portolani M, Piani M, Gazzanelli G, Borgatti M, Bartoletti A, Grossi MP, Corallini A, Barbanti-Brodano G. Restricted replication of BK virus in human lymphocytes. *Microbiologica.* 1985 Jan;8(1):59-66.

Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT. Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature.* 1982 Jan 14;295(5845):110-5.

Shimura H, Umeno Y, Kimura G. Effects of inhibitors of the cytoplasmic structures and functions on the early phase of infection of cultured cells with simian virus 40. *Virology.* 1987 May;158(1):34-43.

Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M. The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 1993;75(5):887–97.

Sundsford A, Flaegstad T, Flø R, Spein AR, Pedersen M, Permin H, Julsrud J, Traavik T. BK and JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons: prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. *J Infect Dis.* 1994 Mar;169(3):485-90.

Sweet BH, Hilleman MR. The vacuolating virus, S.V.40. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1960 Nov;105:420-7.

Takahito Moriyama, J. Pablo Marquez, Tetsuro Wakatsuki, and Andrey Sorokin
Caveolar Endocytosis Is Critical for BK Virus Infection of Human Renal Proximal

Tubular Epithelial Cells_ JOURNAL OF VIROLOGY, Aug. 2007, p. 8552–8562
Vol. 81, No. 16

Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* 2003; 22(33):5192–200.

Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. Genome analysis of the new human polyomaviruses. *Rev Med Virol*. 2012 Mar 28. doi: 10.1002/rmv.1711.

Wang M, Tsou TH, Chen LS, Ou WC, Chen PL, Chang CF, Fung CY, Chang D. Inhibition of simian virus 40 large tumor antigen expression in human fetal glial cells by an antisense oligodeoxynucleotide delivered by the JC virus-like particle. *Hum Gene Ther*. 2004 Nov;15(11):1077-90.

Watanabe S, Yoshiike K. Decreasing the number of 68-base-pair tandem repeats in the BK virus transcriptional control region reduces plaque size and enhances transforming capacity. *J Virol* 1985;55(3):823–5.

Zhu, Z., H. Deng, B. A. Fenderson, E. D. Nudelman, and Z. Tsui. 1990. Glycosphingolipids of human myometrium and endometrium and their changes during the menstrual cycle, pregnancy and ageing. *J. Reprod. Fertil.* 88:71–79.